Spektrophotometrische Untersuchung einiger Blutfarbstoffe

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung
der hohen philosophischen Fakultät der

Universität Basel

von

Josef Strub
aus Emmendingen (Baden)

1926

Johann Ambrosius Barth in Leipzig

Genehmigt von der mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung der philosophischen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. A. Hagenbach u. H. Zickendraht.

Basel, den 27. Mai 1925 Aug. Hagenbach, Dekan

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Sonderabdruck aus der Zeitschrift für wissenschaftliche Photographie, Photophysik und Photochemie, Band XXIV, 1926

Druck von Metzger & Wittig in Leipzig. 43

Meinen hochverehrten Lehrern

Herrn
Prof. Dr. August Hagenbach
Rektor der Universität Basel

und

Herrn
Studienrat Prof. Friedrich Jost
weiland Direktor der Realschule Emmendingen

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548825_0090

In der folgenden Arbeit wird die spektrophotometrische Untersuchung von Oxyhämoglobin, Kohlenoxyhämoglobin und saurem Hämatoporphyrin gegeben; ferner wird eine Methode angedeutet zur Bestimmung des Alters von Blutflecken.

I. Einleitung.

Der Farbstoff des Blutes ist das Hämoglobin, früher Hämaglobin, Hämaglobulin, Hämatoglobulin, Hämokristallin, Hämatokristallin, Chromatin, Cruorin genannt.[1]) Nach der heutigen Ansicht der Blutforscher[2]) hat man im Blut nur ein Hämoglobin [symbolisch geschrieben = Hb[3])] anzunehmen, welches mit Tierspezies und Individuum nicht wechselt, eine konstante Lichtextinktion hat, dessen übrige Eigenschaften aber mit dem Milieu schwanken.

Die kleinste (weil Anzahl der Fe-Molekeln = 1 genommen) Summenformel[4]) für das Hämoglobin nach Hüfners besten Analysen ist:

$$C_{758}H_{1203}O_{218}N_{195}S_3Fe\,.$$

„Seiner chemischen Natur nach ist das Hämoglobin ein Proteid. Es kommt normalerweise in Verbindung mit O_2 als O_2–Hb (= Oxyhämoglobin), ohne O_2 als Hb (auch reduziertes Hb genannt) vor und besteht aus zwei Komponenten: einem Protein, dem Globin, das 95 % der Verbindung ausmacht, und einem farbigen, Fe-haltigen Baustein, der sauerstofffrei ‚Hämachromogen', sauerstoffhaltig ‚Hämatin' genannt wird. Über die Natur der Bindung beider Bestandteile herrscht noch keine völlige Übereinstimmung."[5])

[1]) Tiegerstedt, Handb. d. physiol. Meth. **2**[1]. 68 (1911).

[2]) Fr. Müller in Oppenheimers Handb. d. Biochem. Erg.-Bd. 131. Jena (1912).

[3]) Oppenheimers Handb. d. Bioch. **1**. 405. Anmerkung (1924). (Aus dieser Abhandlung sind sämtliche symbolischen Bezeichnungen vorliegender Arbeit entnommen.)

[4]) Handwörterb. d. Naturwiss. **2**. 55.

[5]) F. Müller u. W. Biehler in Oppeneimers Handb. d. Bioch. **1**. 423 (1924).

Die neuere Forschung[1]) hat einen Zusammenhang zwischen Chlorophyll, Blut- und Gallenfarbstoff und Urobilin festgestellt.

Die Wichtigkeit des Blutes für das Leben der Menschen und der Tiere erklärt die ins Riesenhafte gewachsene wissenschaftliche Literatur über diesen Körper. In den letzten Jahren entstand selbst eine Zeitschrift über die Blutforschung: Folia Haematologia.[2])

Spektroskopisch wurde der Blutfarbstoff zuerst von Hoppe-Seyler 1861[3]), von Vierordt und dann von Hüfner und seinen Mitarbeitern genauer untersucht. Von späteren Forschern seien aus der großen Anzahl nur die folgenden genannt: Vogel[4], L. Lewin[5] und besonders Formánek.[6]) Rost, Franz und Heise[7]) führten eine systematische Photographie der Blutspektra durch, indem sie zur Orientierung das darüber photographierte Spektrum des Heliums benutzten. Aus der Arbeit von F. L. Naumann[8]) wurden manche Methoden zur Herstellung der Farbstofflösungen entnommen. Weiteres spektroskopisches Material lieferte das chronologisch geordnete Literaturverzeichnis 1829—1909 in Tiegerstedts Handb. d. physiol. Meth. Bd. **2** [1]. 313—446.

In der Literatur, die sich mit der spektralen Seite der Blutuntersuchung befaßt, findet man oft halbquantitative Zeichnungen von Absorptionskurven, welche das Verhältnis der absorbierten Lichtmenge zur durchgelassenen als Funktion der Wellenlänge geben sollen. Diese zumeist im Vergleichsspektroskop aus bloßem Schätzen durch das Auge erhaltenen Kurven geben aber ein falsches Bild der tatsächlichen Absorption. Die vorliegende Arbeit hatte den Zweck, Kurven und Zahlen, die den wirklichen Verhältnissen besser entsprechen, mit Hilfe eines Spektralphotometers zu liefern und an den Ergebnissen das Beersche Gesetz zu prüfen.

II. Versuchsanordnung.

Der benutzte Apparat war das Spektralphotometer nach König-Martens der Firma Schmidt u. Hänsch mit kleiner Beleuchtungs-

[1]) Bes. Willstätter, Ztschr. phys. Chem. **87**. 430. 1912; ebenda: H. Fischer u. Reindel **127**. 300. 1923.

[2]) Leipzig, Verlag Dr. Werner Klinkhardt.

[3]) Virchow, Arch. f. pathol. Anat. **23**. 446ff. 1862.

[4]) Praktische Spektralanalyse irdischer Stoffe 2. Aufl. I. Teil. 467ff. 1889.

[5]) Arch. d. Pharm. 235. 1897.

[6]) Ztschr. f. anal. Chem. **40**. 504ff. 1901.

[7]) Beitr. z. Photogr. d. Blutspektra. Arb. d. Kaiserl. Ges. Amts 30. 1909.

[8]) Über d. spektrosk. Verhalt. d. Blutfarbstoffe. Diss. Leipzig bei Georgi.

einrichtung. Bei diesem Apparat werden im Prinzip von zwei in einer Wagrechten liegenden Spalte, die durch dieselbe Mikrometerschraube meßbar verstellt werden können, durch ein Kalkspat- und ein Zwillingsprisma je vier Lichtbündel entworfen. Alle, bis auf zwei zueinander senkrecht polarisierte, werden durch Blenden vernichtet. Die zwei übrigbleibenden treten durch einen Nicol mit Gradteilkreis. Durch Drehen dieses Analysators können sie auf gleiche Helligkeit gebracht werden. Bezüglich genauerer Konstruktionsdetails und Handhabung des Photometers sei auf die Literatur verwiesen.[1])

Weil die beiden Spalte kleine Distanz haben, wurden aus Glas von alten, gesäuberten photographischen Platten, welche gut planparallel sind, mit weißem Siegellack Tröge zusammengekittet, deren eine Seitenwand aber aus Deckglas bestand, so daß der Lichtstrahl mindestens 1 mm weit von der Wandung die Lösung durchlief. Der Durchmesser („Licht") des Absorptionstroges war 0,983 cm. Um Reflexions- und Absorptionsverluste durch die Glaswände und das Lösungsmittel auszugleichen, wurden während der Messung vor beide Spalte gleichgebaute Tröge aufgestellt, von welchen der eine mit dem Lösungsmittel, der andere mit der Farblösung gefüllt war. Die Anwendung solcher Tröge, deren Weite mit dem Mikroskop oder einer feinen Mikrometerschraube gemessen werden kann, ist bequemer als ein Trog mit dem Schulzschen Glaswürfel, weil zur Eliminierung von Reflexions- und Absorptionsverlusten keine Doppelmessungen ausgeführt werden müssen. Als Lichtquelle diente eine Nitra-Halbwattlampe aus Milchglas (150 Watt), die mit 220 Volt betrieben wurde. Die Lampe, „Gazota" (Fabrik inzwischen eingegangen), war im Verhältnis zur Kerzenstärke kleiner als die sonst gebräuchlichen, also spezifisch heller. Über die Birne wurde eine kreisrunde Blechbüchse von 9,5 cm Durchmesser geschoben, aus der eine quadratische Blende von 2,5 cm Seitenlänge geschnitten war. Lampe und Blechbüchse wurden auf dem Tisch unveränderlich befestigt. Über das Ganze wurde ein großer Pappkasten mit Ventilation gestülpt, welcher an der dem Apparat zugekehrten Seite mit einer Asbestplatte ausgekleidet war und ein kreisrundes Loch hatte, das gerade über das Beleuchtungsrohr des Photometers paßte. So war

[1]) Katalog der Firma Schmidt u. Hänsch; F. F. Martens, Verh. phys. Ges. **1**. 280 (1899); F. F. Martens u. Grünbaum, W. **12**. 984. 1903; F. Grünbaum W. **12**. 1004. 1903.

der Apparat möglichst gegen Erwärmung und die Umgebung gegen Licht geschützt. Der Arbeitsraum wurde vollständig verdunkelt.

Am Okularende des Photometers war ein viereckiger, mit vierfachem schwarzen Tuch lose bespannter Holzrahmen (45/30 cm) auf dem Tisch befestigt. In das Tuch waren zwei genau über den Okulartubus und die Fassung der Ableselupe des Teilkreises passende Löcher geschnitten, so daß das Auge vollständig gegen jedes seitliche Licht geschützt war. Dies ist wichtig, da die Genauigkeit der Ablesung durch seitliches Licht stark herabgesetzt wird. Der Teilkreis des Nicols und das Schreibheft war durch eine 6 Voltlampe mit Akkumulatoren schwach, aber genügend beleuchtet.

Die Messung geschieht, wie schon bemerkt, dadurch, daß zwei zueinander senkrecht polarisierte Lichtbündel, von denen das eine durch die Farbstofflösung, das andere durch das Lösungsmittel gegangen ist, durch Drehung des Nicols auf gleiche Helligkeit gebracht werden. Die optische Achse des Nicols liegt bei den Apparaten nicht immer genau in der 0^0—180^0-Richtung. Die genaue Lage muß durch sorgfältige Beobachtung im I. und IV. Quadranten festgestellt werden. Bei dem von mir benutzten Apparat ist die Winkeldifferenz $+0{,}65^0$, also im ersten Quadranten 0^0—90^0. Hat man keine Lösungen im Strahlengang, so kann man zwar eine Reihe von Stellungen der Lampe finden, wo der Nicol bei 45^0 gleiche Helligkeit der Gesichtshälften anzeigt. Diese Stellungen liegen alle auf einer zur Achse des Photometers schiefen Geraden, da die Reflexionsverluste im Innern des Apparates für beide Lichtbündel nicht gleich sind. Die Aufstellung der Lampe auf dieser Geraden ergibt zwar große Ersparnisse an Rechenarbeit, doch wurde sie bald fallen gelassen, weil die Genauigkeit nur in Gelb und Grün ebenso groß ist, wie wenn die Lampe in der Achse des Apparates steht. Sämtliche Zahlenangaben beziehen sich auf Messungen in dieser Stellung. Die Lampe war 6,8 cm vom Beleuchtungsspalt entfernt.

Die beiden Eintrittsspalte waren unverändert auf 0,200 mm Breite, der Okularspalt, welcher einen Spektralstreifen ausblendet, auf 0,14 mm. Leider kann man diesen Spalt wegen Fehlens einer Mikrometerschraube während der Messung nicht meßbar verstellen. Dadurch wird, da kein normales, sondern ein verzerrtes Spektrum vorliegt, z. B. im Rot bei 660 $\mu\mu$ ein Streifen von 8 $\mu\mu$, bei 560 $\mu\mu$ von 5 $\mu\mu$, im Violett bei 420 $\mu\mu$ von 2 $\mu\mu$ ausgeschnitten. Folgende

Tabelle gibt den Ausschnitt des Spaltes in Mikromillimeter als Funktion der Wellenlänge. Die Genauigkeit der Messungen im Blau ist zum Teil auch deshalb am kleinsten, im Rot größer, da sie stark von der Intensität und diese von der Breite des ausgeschnittenen Streifens im Spektrum abhängt.

Ausschnitt:	Bereich:
2 $\mu\mu$	440 $\mu\mu$
4	520
6	600
8	660
10	690

Die Temperatur war bei sämtlichen Versuchen innerhalb des Intervalles $20 \pm {}^3/_4{}^0$ C.

III. Bezeichnungen.

Bezeichnet man die Intensität des einfallenden Bündels mit J, die des durchgegangenen mit J_1, so ergibt die Überlegung, da das absorbierende Medium immer vor dem gleichen Spalte stand:

$$\frac{J_1}{J} = \frac{\mathrm{tg}^2\,\varphi}{\mathrm{tg}^2\,\varphi_0},$$

wenn φ_0, bzw. φ der Drehwinkel des Nicols ist, um von der Stellung einseitiger Dunkelheit zur Stellung gleicher Helligkeit zu gelangen, wenn kein absorbierendes Medium, bzw. wenn sich ein solches im Troge befindet. Die Winkel φ_0 und φ können am Teilkreis bis auf Zehntelgrade abgelesen werden. In den vorliegenden Untersuchungen waren φ_0 und φ immer die Mittel aus 10 Ablesungen, welche nur im Quadranten 0^0—90^0 gemacht wurden. Das Auge ermüdet nach 2—3 Stunden, deshalb konnten die Ablesungen wegen der längeren Zeitdauer nicht in allen vier Quadranten gemacht werden. φ_0 ist nur dann über das gesamte sichtbare Spektrum konstant, wenn das Lösungsmittel farblos ist, also keine Absorption zeigt. Dies war bei destilliertem Wasser und konzentrierter reinster Schwefelsäure der Fall. φ_0 änderte sich nicht merklich durch das Spektrum, und es wurde deshalb φ_0 im Gelb, wo die Augenempfindlichkeit am größten war, für die Messung jeder einzelnen Lösung festgestellt und dieser Wert für jede Wellenlänge benutzt. Im weiteren sind die Bezeichnungen, welche Kayser[1]) vorschlägt, gebraucht. Es bedeutet:

[1]) H. Kayser, Handb. d. Spektroskopie Bd. III. 11. 13.

J_0 = die auffallende Lichtmenge,
J = die einfallende (d. h. von Reflexionsverlusten befreite) Lichtmenge,
J_1 = die durchgegangene Lichtmenge,
d = die Dicke der Schicht.

Dann heißt:

Durchlässigkeit $= \frac{J_1}{J_0}$,

Durchlässigkeitsfaktor $D = \frac{J_1}{J}$ (meist mit 100 multipliziert in Proz.).

Absorptionskoeffizient a definiert durch: $J_1 = Ja^d$,

Absorptionskonstante k definiert durch $J_1 = Je^{-kd}$,

Bunsensche oder dekadische Absorptionskonstante α definiert durch $J_1 = J10^{-\alpha d}$ für eine bestimmte Konzentration und Wellenlänge.

Zur Berechnung von α, a, D dienen also folgende Formeln:

$$\alpha = \frac{2}{d}(\log\mathrm{tg}\ \varphi_0 - \log\mathrm{tg}\ \varphi),$$

$$D = \frac{\mathrm{tg}^2\varphi}{\mathrm{tg}^2\varphi_0},$$

$$a = 10^{-\alpha}.$$

IV. Versuchsergebnisse.

1. Das Oxyhämoglobin.

Das Oxyhämoglobin ist der rote Farbstoff des frischen Blutes und war wohl der erste Eiweißkörper, dessen Kristallisation gelang.[1]) Symbolisch bezeichnet man ihn mit O_2–Hb. Nach der neuesten Forschung[2]) ist das O_2–Hb eine Säure von der Stärke der CO_2. Seine Dissoziationskonstante ist $5 \cdot 10^{-7}$ (die des reduzierten Hb $7{,}5 \cdot 10^{-5}$).

Das Material zu den Untersuchungen war frisches, gesundes Rinderblut, welches nie älter war als 2—3 Stunden, bis die Lösungen hergestellt wurden. Das Blut wurde im Schlachthaus in Flaschen gefüllt, die mit einer Bodendecke Glaskügelchen beschickt waren. Durch sofortiges, einige Minuten dauerndes Schütteln, wurde das Defebrinieren erreicht. Sowohl Glaskugeln, als auch Gefäße, waren jedesmal sorgfältig sterilisiert worden.

[1]) W. Preyer: Die Blutkristalle. Jena 1871.

[2]) A. V. Hill: The acid nature of oxyhämoglobin. Bioch. Jl. **17**. 544. 1924.

Bei der Herstellung der Lösungen ging ich von 50 ccm Blut aus. Die Verdünnung auf das Doppelte geschah durch Zugeben von 50 ccm destilliertem Wasser. So entstand die Lösung 1 : 2. 50 ccm dieser Lösung wurden wieder mit 50 ccm Wasser versetzt. Es entstand Lösung 1 : 4 und so fort. Die Abmessung wurde immer mit der gleichen bei 15° normalen Pipette vorgenommen. Für ausgeglichene Temperatur wurde gesorgt durch zwei bis dreistündiges Stehenlassen des Blutes und des Lösungsmittels im gleichen Raum. Da immer die gleiche Pipette benutzt wurde, bleibt der Volumfehler bei der Verdünnung wohl unter 0,05 %.

Es entstanden folgende Lösungen, wenn unverdünntes Blut als „relative" Konzentration 1 bezeichnet wird („relative" Konzentration als Unterscheidung von der noch später zu definierenden „absoluten" Konzentration, d. h. wirklichen Konzentration. Die Bezeichnungen sind hier gleichsam nur eine Numerierung der Lösungen, welche auch zugleich den Verdünnungsgrad angibt):

rel. Konzentration:

$2^{-1} = 2^{-1}$ ccm Blut pro ccm Lösung
$2^{-2} = 2^{-2}$ „ „ „ „ „
$2^{-3} = 2^{-3}$ „ „ „ „ „
— — — — — — — — — — —
$2^{-12} = 2^{-12}$ „ „ „ „ „

Wegen der Ermüdung der Augen beim Photometrieren konnten an einem Tage höchstens zwei Konzentrationen untersucht werden. Deshalb mußte zu zwei weiteren „relativen" Konzentrationen immer wieder frisches Blut verwendet werden, das gewöhnlich von Tier zu Tier im O_2–Hb-Gehalt nicht unbeträchtlich verschieden ist. Es verhalten sich also immer nur zwei relative Konzentrationen genau wie 1 : 2; nämlich die folgenden:

2^{-1} und 2^{-2};
2^{-4} und 2^{-5};
2^{-6} und 2^{-7};
2^{-8} und 2^{-9};
2^{-11} und 2^{-12}.

Die relative Konzentration 2^{-10} wurde allein an einem Tag gemessen. Lösung 2^{-3}, welche mit 2^{-1} und 2^{-2} zusammen hergestellt wurde, ist durch einen unglücklichen Zufall zerstört worden. Einige weitere Lösungen 2^{-3}, die aus anderem Blut hergestellt wurden, zeigten einen so großen Unterschied im O_2–Hb-Gehalt, daß sie gar nicht recht in die Reihe der untersuchten Lösungen paßten.

Deshalb ist diese Konzentration in den Tabellen und Zeichnungen weggelassen.

Das Photometer wurde geeicht mit den bekannten Wellenlängen eines Messingbogens, so daß zu jeder Fernrohrstellung aus der Eichkurve die Wellenlänge bekannt war. Das Absorptions-

Tabelle 1

Wellenlänge in $\mu\mu$	2^{-1}	2^{-2}	2^{-3}	2^{-4}	2^{-5}	2^{-6}	2^{-7}	2^{-8}	2^{-9}	2^{-10}	2^{-11}	2^{-12}
683,0 ± 4,5	1,026	0,6867		0,2558	0,1395	0,07197	0,0458	0,02747	0,01955	0,01011	0,00876	0,00456
674,9 ± 4,3	1,043	0,6778		0,2563	0,1395	0,07197	0,0458	0,02747	0,01955	0,01011	0,00876	0,00456
665,0 ± 4,1	1,046	0,7035		0,2615	0,1410	0,07197	0,0458	0,02747	0,01955	0,01011	0,00876	0,00456
657,5 ± 4,0	1,071	0,7168		0,2643	0,1435	0,07217	0,04688	0,02747	0,01955	0,01011	0,00876	0,00456
651,5 ± 3,9	1,080	0,7391		0,2825	0,1481	0,0728	0,0478	0,02047	0,01955	0,01011	0,00876	0,00456
645,3 ± 3,8	1,146	0,7641		0,2860	0,1538	0,07406	0,04794	0,02747	0,01955	0,01011	0,00876	0,00456
636,5 ± 3,7	1,253	0,8150		0,3114	0,1682	0,0778	0,0500	0,02757	0,01955	0,01011	0,00876	0,00456
627,3 ± 3,5	1,406	0,9123		0,3488	0,1892	0,0867	0,05422	0,03009	0,01955	0,01011	0,00876	0,00456
621,8 ± 3,4	1,585	0,9956		0,3827	0,2105	0,0954	0,0575	0,0328	0,01955	0,01011	0,00876	0,00456
615,5 ± 3,3	1,787	1,120		0,4200	0,2337	0,1042	0,06049	0,03902	0,0210	0,01011	0,00876	0,00456
610,5 ± 3,2	2,161	1,303		0,4860	0,2680	0,1180	0,0671	0,0410	0,0213	0,0124	0,00876	0,00456
604,9 ± 3,15	2,657	1,606		0,5964	0,3160	0,1378	0,07717	0,04794	0,02482	0,01630	0,00876	0,00456
600,0 ± 3,1	∞	2,133		0,7886	0,4091	0,1659	0,09954	0,06259	0,03115	0,02210	0,0100	0,00600
597,0 ± 3,0	—	2,590		0,9914	0,5047	0,1856	0.1217	0,0766	0,0395	0,0260	0,0105	0,0072
593,4 ± 2,9	—	∞		1,318	0,7256	0,3072	0,1672	0,1032	0,0513	0,03526	0,01406	0,00877
584,8 ± 2,8	—	—		∞	1,924	1,105	0,4574	0,2773	0,1151	0,08389	0,03508	0,01615
578,4 ± 2,7	—	—		—	∞	1,660	0,8424	0,5095	0,2536	0,1393	0,0614	0,02511
575,4 ± 2,65	—	—		—	—	1,773	0,8911	0,5411	0,2670	0,1434	0,06277	0,02780
572.8 ± 2,6	—	—		—	—	1,668	0,8450	0,5128	0,2546	0,1393	0,06016	0,0260
567,5 ± 2,5	—	—		—	∞	1,320	0,6669	0,4051	0,1945	0,1195	0,05012	0,02299
562,8 ± 2,45	—	—		—	2,808	1,099	0,5554	0,3408	0,1677	0,09532	0,0386	0,0194
560,0 ± 2,4	—	—		—	2,930	1,073	0,5390	0,3279	0,1631	0,09325	0,03508	0 01827
555,9 ± 2,35	—	—		—	3,000	1,118	0,5665	0,3424	0,1703	0,09636	0,04244	0,02090
551,0 ± 2,25	—	—		—	∞	1,351	0,6779	0,4187	0,2068	0,1195	0,05546	0,02299
545,1 ± 2,15	—	—		—	—	1,666	0,8231	0,4884	0 2531	0,1331	0,0655	0,0275
541,7 ± 2,1	—	—		—	—	1,743	0,8646	0,5286	0,2608	0,1397	0,0685	0,02824
538.4 ± 2,0	—	—		—	—	1,703	0,8476	0,5128	0,2567	0,1362	0,06694	0,0280
532,0 ± 1,95	—	—		—	∞	1,337	0 7056	0,4293	0,2145	0,1181	0,05443	0,02780
527,0 ± 1,85	—	—		—	2,968	1,113	0,5649	0,3398	0,1744	0,08336	0,04659	0,0225
521,0 ± 1,8	—	—		—	2,072	0,8257	0,4161	0,2562	0,1290	0,07034	0,0389	0,01878
517,9 ± 1,75	—	—		—	1,907	0,7380	0,3794	0,2260	0,1127	0,06410	0,0365	0,01721
512,7 ± 1,65	—	—		—	1,633	0,6599	0,3388	0,2007	0,1011	0,06199	0,0325	0,01563
505,5 ± 1,6	—	—		—	1,678	0,6599	0,3378	0 2073	0,0993	0,0602	0,02930	0,0124
502,0 ± 1,55	—	—		—	1,766	0,6710	0,3450	0,2080	0,1008	0,0613	0,0286	0,0114
495,4 ± 1,45	—	—		—	1,823	0,7015	0,3600	0,2208	0,1027	0,0640	0,0275	0,0110
489,0 ± 1,4	—	—		—	1,998	0,7490	0,3818	0,2374	0,1140	0,0693	0,0288	0,0110
483,0 ± 1,35	—	—		—	2,173	0,8123	0,4115	0 2557	0,1240	0,07557	0,0325	0,0124
477,4 ± 1,3	—	—		—	2,456	0,8905	0,4475	0,2813	0,1368	0,0823	0,0378	0,0154
472.0 ± 1,25	—	—		—	2,873	0,9819	0,4990	0,3090	0,1520	0,0933	0,0448	0,0208
464,9 ± 1,15	—	—		—	∞	1,165	0,5934	0,3624	0,1794	0,1110	0,0575	0,0300
460,0 ± 1,1	—	—		—	—	1,328	0,6820	0,4230	0,2040	0,1274	0,0694	0,0380
454,9 ± 1,1	—	—		—	—	1,550	0,7934	0,4870	0,2456	0,1491	0,0840	0,0492
446.0 ± 1,05	—	—		—	—	∞	1,072	0,6733	0,3627	0,2036	0,1184	0,0732
438,0 ± 1,00	∞	∞		∞	∞	∞	1,789	0,9585	0,4753	0,2680	0,1586	0,10125

Oxyhämoglobin: Dekadische Absorptionskonstante α.

spektrum des O_2–Hb wurde an etwa 65 immer gleichen Stellen gemessen und für diese Punkte zuerst die dekadischen Absorptionskonstanten und daraus die zugehörigen Durchlässigkeitsfaktoren gerechnet. Die Zahlen zu 44 dieser Stellen sind in den Tabellen 1 und 2 aufgezeichnet: Die erstere enthält die dekadischen Ab-

Tabelle 2.

Wellenlänge in $\mu\mu$	2^{-1}	2^{-2}	2^{-3}	2^{-4}	2^{-5}	2^{-6}	2^{-7}	2^{-8}	2^{-9}	2^{-10}	2^{-11}	2^{-12}
683,0 ± 4,5	9,412	20,57		55,5	72,6	84,73	90,0	93,87	95,60	97,70	98,00	98,96
674,9 ± 4,3	9,062	20,4		55,4	72,6	84,73	90,0	93,87	95,60	97,70	98,00	98,96
665,0 ± 4,1	9,00	19,8		54,8	72,3	84,73	90,0	93,87	95,60	97,70	98,00	98,96
657,5 ± 4,0	8,492	18,76		54,4	71,87	84,69	89,77	93,87	95,60	97,70	98,00	98,96
651,5 ± 3,9	7,80	18,23		52,2	71,11	84,6	89,6	93,87	95,60	97,70	98,00	98,96
645,3 ± 3,8	7,143	17,21		51,76	70,18	84,32	89,55	93,87	95,60	97,70	98,00	98,96
636,5 ± 3,7	5,591	15,30		48,82	67,89	83,6	89,2	93,87	95,60	97,70	98,00	98,96
627,3 ± 3,5	3,835	12,24		44,8	64,7	81,9	88,27	93,31	95,60	97,70	98,00	98,96
621,0 ± 3,4	2,60	10,10		41,4	61,6	80,3	87,6	92,7	95,60	97,70	98,00	98,96
615,5 ± 3,3	1,633	7,591		38,03	58,39	78,67	87,00	91,41	95,48	97,70	98,00	98,96
610,5 ± 3,2	0,707	4,977		32,66	54,00	76,20	85,70	91,0	95,2	97,2	98,00	98,96
604,9 ± 3,15	0,202	2,480		25,33	48,31	72,81	83,72	89,55	94,45	96,32	98,00	98,96
600,0 ± 3,1	0,000	0,7364		16,27	39,0	68,25	79,52	86,58	93,08	95,04	97,8	98,7
597,0 ± 3,0	—	0,257		10,20	31,28	65,25	75,6	83,8	91,30	94,25	97,6	98,4
593,4 ± 2,9	—	0,000		4,804	18,81	49,30	68,05	78,86	88,9	92,20	96,81	98,00
584,8 ± 2,8	—	—		0,000	1,190	7,85	34,88	52,80	76,72	82,43	92,24	96,35
578,4 ± 2,7	—	—		—	0,000	2,187	14,37	30,94	55,77	72,56	86,80	94,38
575,4 ± 2,65	—	—		—	—	1,687	12,85	28,76	54,08	71,60	86,54	93,80
572,8 ± 2,6	—	—		—	—	2,146	14,29	30,71	55,64	72,56	87,06	94,2
567,5 ± 2,5	—	—		—	0,000	4,790	21,53	39,35	63,90	75,94	89,10	94,84
562,8 ± 2,45	—	—		—	0,156	7,958	27,83	45,62	67,96	80,29	91,5	95,6
560,0 ± 2,4	—	—		—	0,117	8,445	28,91	47,00	68,69	80,68	92,24	95,88
555,9 ± 2,35	—	—		—	0,100	7,614	27,13	45,45	67,56	80,10	90,69	95,30
551,0 ± 2,25	—	—		—	0,000	4,446	20,99	38,13	62,11	75,94	88,01	94,84
545,1 ± 2,15	—	—		—	—	2,160	15,03	32,48	55,83	73,25	86,0	93,85
541,7 ± 2,1	—	—		—	—	1,807	13,66	29,61	54,85	72,50	85,40	93,70
538,4 ± 2,0	—	—		—	—	1,981	14,20	30,71	55,37	73,15	85,72	93,75
532,0 ± 1,95	—	—		—	0,000	4,60	19,70	37,21	61,02	76,18	88,22	93,80
527,0 ± 1,85	—	—		—	0,108	7,704	27,24	45,73	66,92	82,54	89,83	95,0
521,0 ± 1,8	—	—		—	0,846	14,94	38,36	55,44	74,30	85,06	91,25	95,77
517,9 ± 1,75	—	—		—	1,253	18,28	41,74	59,40	77,20	86,26	91,90	96,16
512,7 ± 1,65	—	—		—	2,328	21,88	45,84	63,00	79,24	86,70	92,8	96,47
505,5 ± 1,6	—	—		—	2,095	21,88	45,94	62,04	79,6	87,1	93,48	97,2
502,0 ± 1,55	—	—		—	1,723	21,33	45,2	62,00	79,3	86,8	93,7	97,4
495,4 ± 1,45	—	—		—	1,503	19,88	43,7	60,2	78,95	86,3	93,8	97,5
489,0 ± 1,4	—	—		—	1,006	17,83	41,55	57,90	77,00	85,2	93,6	97,5
483,0 ± 1,35	—	—		—	0,671	15,41	38,80	55,51	75,2	84.03	92,8	97,2
477,4 ± 1,3	—	—		—	0,35	12,87	35,7	52,25	73,1	82,8	91,7	96,5
472,0 ± 1,25	—	—		—	0,134	10,43	31,7	49,1	70,5	80,7	90,2	95,3
464,9 ± 1,15	—	—		—	0,000	6,893	25,5	43,4	66,2	77,5	87,6	93,3
460,0 ± 1,1	—	—		—	—	4,696	20,8	37,76	62,5	74,57	85,2	91,6
454,9 ± 1,1	—	—		—	—	2,820	16,09	32,6	56,8	70,94	82,4	89,3
446,0 ± 1,05	—	—		—	—	0,000	8,47	21,22	43,38	62,63	76,2	84,5
438,0 ± 1,00	0,000	0,000	0000	0,000	0,000	0,000	1,62	11,0	33,5	54,0	69,4	79,0

Oxyhämoglobin: Durchlässigkeitsfaktoren in Prozenten.

sorptionskonstanten, die zweite die Durchlässigkeitsfaktoren in Prozenten. An den extremen Stellen der Kurven wurde eine größere Anzahl sehr benachbarter Punkte gemessen. Diese sind aber in den Tabellen bis auf die der Maxima und Minima weggelassen, zu deren genaueren Bestimmung sie dienten. Die in der linken Spalte der Tabellen angegebenen Zahlen sind Spektralausschnitte, deren Breite insbesondere von der Weite des Okularspaltes abhängt. Es sind deshalb die Schwerpunkte der Spektralbereiche gegeben und dazu mit Vorzeichen ± die halben Breiten in Mikromillimeter zugefügt, welche, da das Spektrum verzerrt ist, von Rot bis Blau stetig abnehmen, wie auch aus der Tabelle Seite 101 zu sehen ist.

Das Molekulargewicht des Rinderhämoglobins wird mit 16321[1]) angenommen, ist aber noch nicht so sicher bestimmt, daß man Konzentrationen darauf beziehen kann. Besonders wird die Zahl nach neuerer Ansicht[2]) wegen der Dissoziation und Aggregierung der Molekeln zu modifizieren sein. Man definiert daher in der Blutforschung als Konzentration: die Anzahl Gramm Farbstoff in einem ccm Lösung. Im unverdünnten, frischen und gesunden Blut sind durchschnittlich 0,14 g O_2–Hb pro ccm enthalten. Es hat also die Konzentration 0,14.

Die „absoluten" Konzentrationen der untersuchten Lösungen sind:

„rel." Konz.	absol. Konz.
2^{-1}	0,0408 g O_2–Hb pro ccm Lösung
2^{-2}	0,0246 „ „ „ „ „
2^{-3}	
2^{-4}	0,00918 „ „ „ „ „
2^{-5}	0,00506 „ „ „ „ „
2^{-6}	0,002227 „ „ „ „ „
2^{-7}	0,001115 „ „ „ „ „
2^{-8}	0,000676 „ „ „ „ „
2^{-9}	0,000337 „ „ „ „ „
2^{-10}	0,000185 „ „ „ „ „
2^{-11}	0,0000803 „ „ „ „ „
2^{-12}	0,0000373 „ „ „ „ „

Die Konzentration wurde mit der von Hüfner[3]) angegebenen Vierordschen Konstanten A gerechnet, welche mit dem vom eben

[1]) G. Hüfner u. E. Ganser: Arch. (Anat. u.) Phys. p. 209. 1907.

[2]) W. M. Bayliss: Interfac. phenom. with. espec. ref. to colloids and enzymes. Bull. of the Johns Hopkins hosp. **33**. 307. 1922.

[3]) Du Bois Reymonds Arch. f. Physiol. p. 138. 1897.

genannten Forscher angegebenen Fehler $\pm$ 2,5 % behaftet ist. Diese Zahlen sind für 535 $\mu\mu$ bis 542,5 $\mu\mu$:

$$A = 0{,}001312$$

für 554 $\mu\mu$ bis 565 $\mu\mu$

$$A' = 0{,}002070.$$

Es ist ja als Konsequenz aus dem Beerschen Gesetz $\frac{c}{\alpha} = A$ konstant für eine bestimmte Wellenlänge, wenn c die Konzentration, α die dekadische Absorptionskonstante bedeutet. A und A' wurde von Hüfner für eine etwa auf das 100fache verdünnte Blutlösung bestimmt. Es wird später noch gezeigt werden, daß das Beersche Gesetz bei O_2–Hb nicht stimmt, bzw. nicht angewendet werden darf. Deshalb werden wohl die aus A errechneten Konzentrationen oberhalb und unterhalb der Lösungen 2^{-6} und 2^{-7} (= etwa $^1/_{100}$ Blut) noch mehr als 2,5 % falsch sein. (Für die erste Konzentration etwa 30 %.) Die Zahlen werden als Behelf jedoch angegeben, da über die Konstanz des A anscheinend noch keine Sicherheit erzielt ist. Sobald dies endgültig der Fall ist, können die genaueren „absoluten" Konzentrationen mit leichter Mühe aus der Tabelle der dekadischen Absorptionskonstanten der „relativen" Konzentrationen errechnet werden.

Sehr übersichtlich gestalten sich die Tabellen in der Darstellung als Kurven. Dazu eignen sich die dekadischen Absorptionskonstanten nicht gut, weil sie von O nach ∞ gehen. Besser sind die Durchlässigkeitsfaktoren darzustellen, weil sie nur zwischen 0 und 100 liegen. Fig. 1 zeigt für die untersuchten 11 Oxyhämoglobinlösungen die Durchlässigkeitsfaktoren von unten nach oben in Prozenten. Kehrt man die Skala von 0—100 um und liest von oben nach unten, so hat man die Absorption in Prozenten, welche auch oft angegeben wird. Die Abszissenachse gibt die Wellenlängen in $\mu\mu$.

Die Figur 1 zeigt den starken und raschen Anstieg der Absorption im Orange und die für das Oxyhämoglobin so charakteristischen (α und β genannten), und deutlichen Maxima bei $\alpha = 575{,}4\ \mu\mu$ und $\beta = 541{,}7\ \mu\mu$, (Formánek[1]) $\alpha = 578{,}1\ \mu\mu$ und $\beta = 541{,}7\ \mu\mu$. Schumm:[2]) spektrogrammetrisch $\alpha = 576{,}9\ \mu\mu$ $\beta = 542{,}4\ \mu\mu$, okular: $\alpha = 577{,}5$ $\beta = 541{,}7$).

[1]) Ztschr. f. anal. Chem. **40**. 505. 1901.

[2]) O. Schumm: Blutspektroskopie. Abderhaldens Handb. d. biol. Arb. Meth. Lief. 43.

Ferner ist die gute Durchlässigkeit für rote und die schlechte Durchlässigkeit für violette Strahlen zu sehen. Beide Eigenschaften, die Durchlässigkeit für Wärmestrahlen, sowie die Undurchlässigkeit für die physiologisch schädlichen ultravioletten Strahlen, scheinen

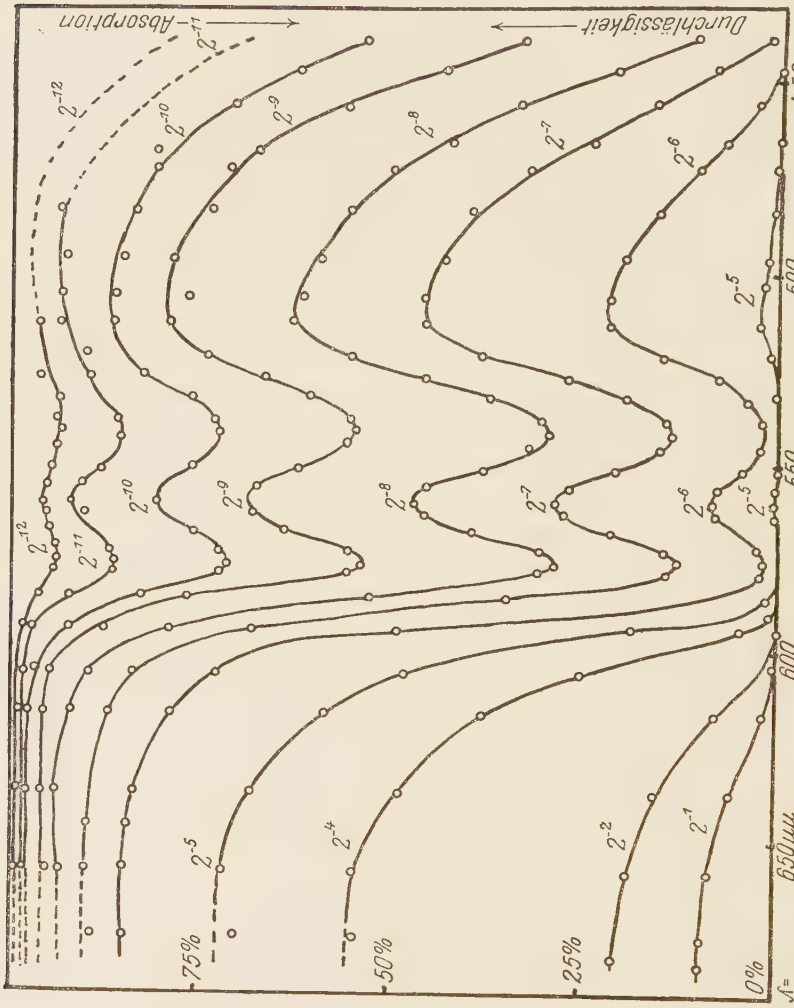

Fig. 1.
Oxyhämoglobin: Durchlässigkeit in Prozenten.

für die Blutfarbstoffe charakteristisch zu sein. Augenscheinlich ist bis weit ins Ultrarote kein größeres Absorptionsmaximum zu erwarten. Jedoch ist die Empfindlichkeit der Augen nicht mehr groß im Hochrot, so daß schwache Banden nicht festgestellt werden können. Ebenso müssen im Ultravioletten ein oder

mehrere sehr starke Maxima liegen. Schumm[1]) gibt ein Band γ (Soretband) für O_2–Hb in einer 1%igen Sodalösung bei 414 $\mu\mu$ an. In wäßriger Lösung von 407,9—411,5 schwankend. Ein weiteres, von Soret bei 330 $\mu\mu$ festgestelltes, aber Verunreinigungen zugeschriebenes Band γ', wird von Peygrega und Vlès[2]) dem O_2–Hb zugeschrieben.

In neuerer Zeit zeigt sich immer deutlicher die Aussicht, in die gesetzmäßigen Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und spektralen Eigenschaften einzudringen. Für Blut liegen auf diesem Gebiet nur einige ältere Arbeiten von Vlès[3]) vor. Dieser versucht eine mathematische Analyse der Körper mit spektraler Struktur der Hämoglobinklasse und gibt folgende Formel an:

$$\lambda_x = \lambda_\gamma + n \cdot a,$$

wo λ_x die Wellenlänge irgendeines Bandes, λ_γ die des ultravioletten Bandes γ, a ein bestimmter Modul ($\alpha_1 = 45$, $\alpha_2 = 35$) und n ($= 1, 2, 3 \ldots$) eine ganze Zahl bedeutet. Man hat also das O_2–Hb-Spektrum als Überlagerung von zwei Serien aufzufassen, eine für den Modul α_1, die andere für α_2. Dies scheint auf die Pyrrolstruktur des Farbstoffmoleküls hinzudeuten.

Es scheint mir nicht befriedigend, bei der Angabe des Fehlers bei Absorptionskurven zu sagen: er beträgt so und soviel Prozent; denn man hat einen doppelten Gang des Beobachtungsfehlers zu unterscheiden:

1. Abhängigkeit von der Wellenlänge.
2. Abhängigkeit von der Absorption.

Der erstere Gang wurde durch das ganze sichtbare Spektrum am leeren Photometer untersucht bei Nicolstellung von 52°. Die Empfindlichkeit der Augen wurde am größten im Gelb und Hellgrün gefunden, die geringste Empfindlichkeit im Violett. Der Fehler konnte durch eine einfache nach unten konvexe Kurve dargestellt werden, wenn nach oben seine Größe und wagrecht die Wellenlänge aufgetragen war. Die verschiedenen Angaben über die Lage des Empfindlichkeitsmaximums sind jeden-

[1]) Ebenda.
[2]) C. R. **154**. 133.
[3]) C. R. **158**. 1206. 1914; Soc. Biol. **74**. 751. 1914; ebenda **74**. 655. 1914.

falls zum Teil auf die verschiedenen Intensitätsverteilungen der von verschiedenen Untersuchern verwendeten Lichtquellen zurückzuführen.

Die zweite Abhängigkeit des Fehlers wurde untersucht an der Kurve der Lösung 2^{-6} des Oxyhämoglobins. Die Kurve des Fehlers ist für etwa 20 Punkte in Fig. 2 als Funktion der Wellenlänge dargestellt. Im allgemeinen ist der Charakter der unter 1 genannten Kurve noch zu sehen. Aber die Abhängigkeit von der Absorption gibt sich durch das ziemlich starke Maximum an Stelle des stärksten Steigens der Fig. 1, bei etwa 595 $\mu\mu$, kund. Dort wird das Gesichtsfeld eben durch den scharfen Anstieg inhomogen, so daß die Einstellung auf gleiche Helligkeit schwieriger, also mit größerem Fehler behaftet wird. Der Okularspalt ist für diesen Teil des Spektrums zu breit. Die beste Empfindlichkeit liegt am Absorptionsmaximum 575,1 $\mu\mu$. Darauf wird sie beim Absorptionsminimum 560 $\mu\mu$ wieder etwas kleiner, ein wenig besser am zweiten Absorptionsmaximum 541,7 $\mu\mu$. Jetzt tritt noch einmal, wenn auch weniger deutlich, da der Spektralausschnitt hier schon enger ist, die Erscheinung der Abhängigkeit vom Anstieg der Absorption ein: Der Fehler steigt bei 500 $\mu\mu$ bis 0,9 %, bleibt im Blau ein Stück auf etwa gleicher Höhe und nimmt (von 475 $\mu\mu$ ab) sehr rasch im Violett zu. Folgende Tabelle 2a gibt die Größe der Fehler für verschiedene Wellenlängen:

Fig. 2. Mittlerer Fehler der Absorptionskurve 2^{-6} von Oxyhämoglobin.

Tabelle 2a.

Wellenlänge $\mu\mu$	Fehler in %	Wellenlänge $\mu\mu$	Fehler in %
674,9	1,0	551	0,3
657,5	0,55	541,7	0,3
645,3	0,50	532	0,36
627,3	0,45	521	0,62
604,9	0,53	512,7	0,73
593	0,80	500	0,95
578	0,3	475	0,82
575	0,3	465	1,8
567	0,3	445	etwa 3—4
560	0,38		

Bei jeder anderen Kurve wird der Fehler wieder etwas anders liegen, entsprechend den zwei genannten Abhängigkeitsbedingungen. Aber auch noch schlecht kontrollierbare physiologische Einflüsse spielen mit, welche man am besten durch gutes Ausruhen der Augen und durch mäßig langes Arbeiten klein hält. Von Wichtigkeit ist es auch, daß man zwei bis drei Monate lang Probemessungen mit dem Photometer ausgeführt hat. Es wurde nämlich im vorliegenden Fall festgestellt, daß nach dieser Zeit die Fehler durch Übung der Augen auf ein Drittel herunter gegangen waren, von da an aber die Empfindlichkeit nur noch wenig zunahm.

Hüfner[1]) gibt zur qualitativen Bestimmung von O_2–Hb für die Wellenlängenbereiche $\lambda_1 = 534—542\ \mu\mu$ und $\lambda_2 = 556{,}5—564{,}5\ \mu\mu$ die Zahl

$$\frac{\alpha_{\lambda_1}}{\alpha_{\lambda_2}} = 1{,}578 \pm 2{,}5\,\%.$$

Es ist nämlich, als Folge des Lambertschen Gesetzes für jedes Spektrum desselben, in allen Lösungen unveränderlichen Farbstoffes $\frac{\alpha_{\lambda x}}{\alpha_{\lambda y}} = \text{constans}$, worin $\alpha_{\lambda x}$ und $\alpha_{\lambda y}$ die dekadischen Absorptionskonstanten für zwei bestimmte Wellenlängen bedeuten. Die beiden von Hüfner angegebenen Spektralbereiche liegen im Minimum zwischen den Absorptionsbanden α und β und im Maximum β. Für das König-Martenssche Spektralphotometer nimmt man, der größeren Empfindlichkeit entsprechend, besser das Maximum α bei $\lambda_3 = 578{,}4\ \mu\mu \pm 2{,}6\ \mu\mu$ und das schon von Hüfner benutzte Minimum $\lambda_4 = 560\ \mu\mu \pm 2{,}5\ \mu\mu$. Für diese Bereiche ist für 128fach verdünntes Blut

$$\frac{\alpha_{\lambda_3}}{\alpha_{\lambda_4}} = 1{,}651 \pm 0{,}5\,\%.$$

[1]) Du Bois Reymonds Arch. f. Physiol. 1897. S. 137.

Bei steigender Verdünnung scheint $\frac{\alpha_{\lambda_3}}{\alpha_{\lambda_4}}$ abzunehmen. Aus vorliegenden Beobachtungen wurden folgende Zahlentabelle gewonnen.

Tabelle 3.

„relative" Konzentr.	$\frac{\alpha_{\lambda_3}}{\alpha_{\lambda_4}}$	„relative" Konzentr.	$\frac{\alpha_{\lambda_3}}{\alpha_{\lambda_4}}$
2^{-6}	1,652	2^{-10}	1,538
2^{-7}	1,651	2^{-11}	1,788
2^{-8}	1,648	2^{-12}	1,520
2^{-9}	1,638		

Sieht man durch eine ziemlich starke Blutlösung nach einer Lichtquelle, so erkennt man einen Lichthof, verursacht durch eine Trübung. Diese stört natürlich das Photometrieren, denn es entstehen durch innere Reflexion und außerdem durch Beugung Lichtverluste. In der Literatur werden verschiedene chemische Mittel angegeben, die Trübung zu beseitigen. Diese Art des Arbeitens wurde jedoch als unzweckmäßig vermieden, weil es durchaus nicht sicher ist, daß beim Zusatz von auch neutralen Chemikalien die Konstitution des komplizierten Farbstoffes erhalten bleibt. Ein weiteres Mittel, das Filtrieren, hilft auch nicht. (Nach Einsendung der Arbeit wurden mit Porzellanfiltern bessere Ergebnisse erzielt.) Die Suspension geht durch das gewöhnliche Filter fast restlos hindurch. Ferner hat das Filtrieren den Nachteil, Farbstoffverluste zu verursachen, welche sich nicht meßbar verfolgen lassen.

Bei weiteren Versuchen wurden neue Blutlösungen bis zu anderthalb Stunden in eine Zentrifuge gebracht, welche pro Minute 6000 Touren machte. Es setzt sich während der ersten 40 Minuten ein weißlicher, kräftiger, aber nur geringer Bodensatz ab. Schüttet man die Lösungen ab und zentrifugiert sie wieder (bis zu 50 Minuten), so wiederholt sich das Absetzen nicht mehr. Trotzdem aber ist die Trübung, wenn auch viel geringer, noch vorhanden. Diese Versuche sind mit Blut von etwa 100facher Verdünnung gemacht worden. Die spektralphotometrische Untersuchung einer solchen zentrifugierten Lösung ergab das Bild der Fig. 3. Kurve I gibt als Funktion der Wellenlänge die Durchlässigkeitsfaktoren der unzentrifugierten etwa 100fach verdünnten Blutlösung, Kurve II das der 45 Minuten auf 6200 Touren gebrachten Lösung. Fig. 3 läßt darauf schließen, daß das wagrechte Stück der Absorptionskurven in Fig. 2 im Rot nach Ultrarot auf die oben besprochene Trübung

allein zurückzuführen ist. Das gleiche läßt auch das später gebrachte Bild des Kohlenoxyhämoglobins vermuten, welches, da dort keine Trübung vorhanden, im Rot vollständige Durchlässigkeit zeigt (siehe Fig. 4).

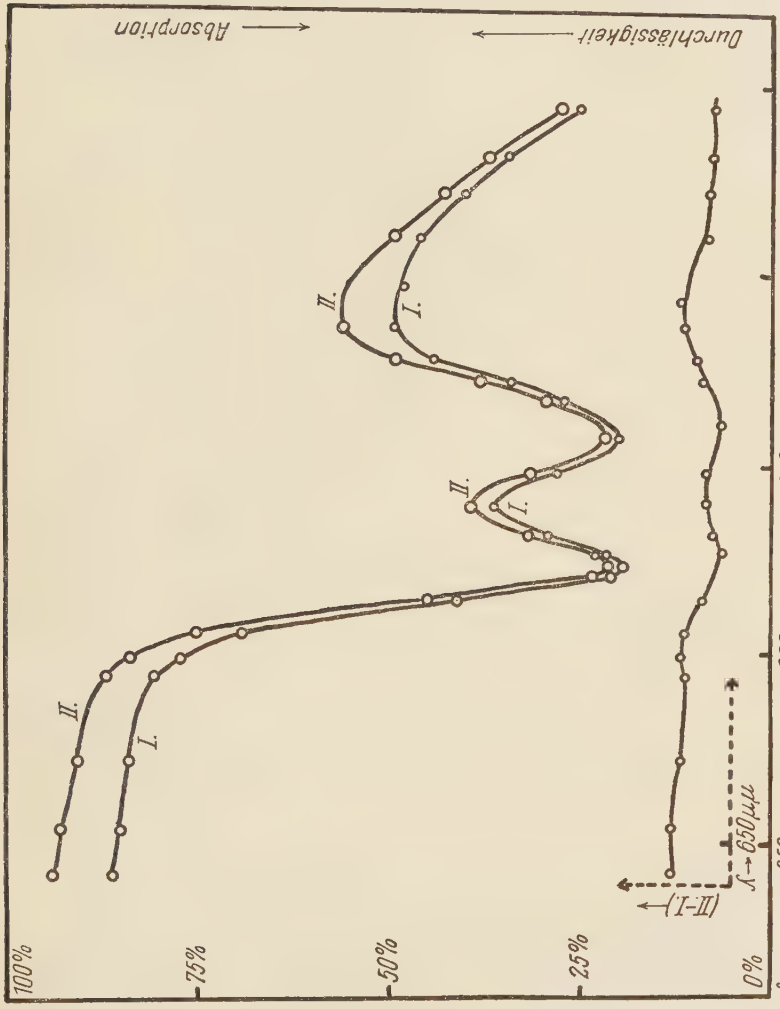

Fig. 3.
Oxyhämoglobin; unzentrifugierte (I.) und zentrifugierte (II.) Lösung.

Auf der unteren Hälfte der Fig. 3 sind noch die Differenzen der beiden Kurven (also der Durchlässigkeiten) aufgetragen.

Tabelle 4 gibt die Durchlässigkeitsfaktoren in Prozenten und die dekadischen Absorptionskonstanten zu Fig. 3, ferner die Differenzen der beiden Kurven.

Beim Vergleich der von Formánek, Lewin und anderen Forschern gegebenen Darstellungen der Absorptionsspektren der Blutfarbstoffe, welche nur durch Schätzung der Intensitäten neben einem Vergleichsspektrum entstanden sind, und der bildlichen Dar-

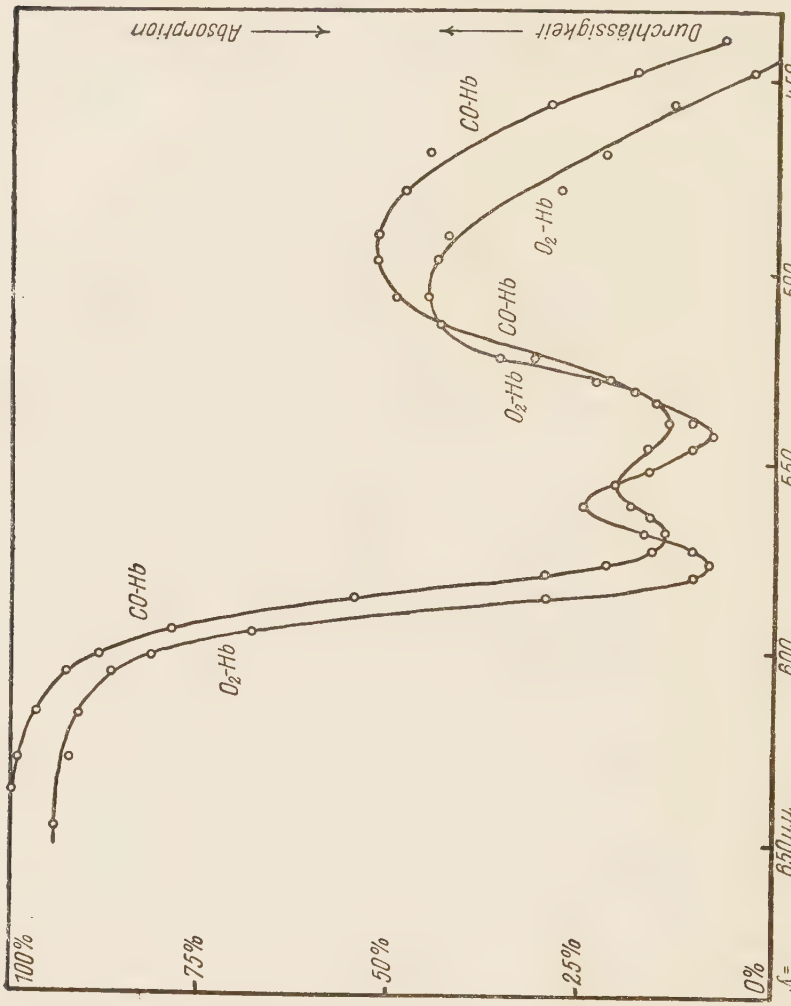

Fig. 4.
Oxyhämoglobin und Kohlenoxyhämoglobin: Durchlässigkeit in Prozenten.

stellungen dieser Arbeit ist erkenntlich, wie schlecht man sich bei solchen Intensitätsschätzungen allein auf das Auge verlassen kann. Die Minima, wo zu 50% noch Absorption herrscht, sind in jenen Zeichnungen z. B. als vollkommen durchlässige Stellen angegeben, so sehr wirkte der Kontrast fehlerhaft ein. Es ist deshalb klar, daß nur mit Hilfe des Photometerapparates der Wirklichkeit tatsächlich

Tabelle 4.

Wellenlängen in $\mu\mu$	α_z	α_u	D_z	D_u	$D_z - D_u$
657,5	0,02710	0,06503	93,95	86,09	7,95
645,3	0,03186	0,07028	92,93	85,06	7,8
627,3	0,04223	0,07500	90,73	83,95	6,7
604,9	0,06031	0,09225	87,03	80,86	6,1
600,0	0,0755	0,1125	84,04	77,17	6,8
593,4	0,0235	0,1602	75,26	69,16	6,1
584,8	0,3444	0,3850	45,24	41,21	4,0
578,4	0,6432	0,6769	23,27	21,04	2,3
575,4	0,6765	0,7115	21,06	19,43	1,7
572,8	0,6376	0,6642	23,04	21,67	1,3
567,5	0,4969	0,5341	31,85	29,24	2,7
560,0	0,4028	0,4417	39,56	36,16	3,4
557,5	0,4117	0,4468	38,76	35,74	3,1
551,0	0,5008	0,5525	31,57	28,02	3,6
543,4	0,6518	0,6927	22,29	20,29	2,0
541,7	0,6598	0,7016	21,89	19,88	2,0
538,4	0,6478	0,6805	22,50	20,87	1,6
532,0	0,5281	0,5662	29,64	27,15	2,4
527,0	0,4180	0,4654	38,20	34,24	4,0
521,0	0,3074	0,3538	49,27	44,28	5,0
512,7	0,2508	0,3037	56,13	49,69	6,4
505,5	0,2504	0,3062	56,2	49,4	6,8
489,0	0,3052	0,3358	49,52	46,15	3,3
477,4	0,3663	0,3967	43,02	40,11	2,9
467,8	0,4293	0,4619	37,21	34,52	2,7
454,9	0,5576	0,5986	27,70	25,2	2,5

Zentrifugiertes und unzentrifugiertes Blut.
Durchlässigkeitsfaktoren in Prozenten (D_z bzw. D_u).
Dekadische Absorptionskonstanten (α_z bzw. α_u).

entsprechende Intensitätskurven gegeben werden können, und diese müssen wieder eine sehr große Anzahl von Punkten des Spektrums ausmessen, ein Umstand, der die Spektralphotometrie so ermüdend und zeitraubend macht.

2. Kohlenoxyhämoglobin.

Kohlenoxyhämoglobin heißt der Farbstoff, welcher aus dem Oxyhämoglobin entsteht, wenn Kohlenoxydgas mit Blut in innige Berührung kommt. Das Kohlenoxyd verdrängt den Sauerstoff. Symbolisch wird dieser Farbstoff CO–Hb geschrieben. Der Entdecker des CO–Hb war ein Arzt des Waldenburger Kohlengebietes, welcher den Farbstoff zuerst bei in Gruben verunglückten Bergleuten fand. Er teilte seine Entdeckung Hoppe-Seyler mit, dem wir die ersten genaueren Kenntnisse darüber verdanken.[1]) Die Entstehung von

[1]) Arch. Pathol. (Virchow) XI. 288. 1857.

CO–Hb ist bekanntlich die Ursache des Todes jener Menschen, welche durch das Gas nicht gut „ziehender" Öfen vergiftet worden sind, und seine Untersuchung ist für die Medizin eben wegen dieser häufigen Unglücksfälle wichtig. Die Banden des Kohlenoxyhämoglobins sind im Vergleich zu jenen des Oxyhämoglobins gegen das blaue Ende des Spektrums mehr oder weniger (bis etwa 8 $\mu\mu$) verschoben, je nachdem der Sättigungsgrad der Lösung mit CO größer oder kleiner ist. Der Tod tritt, wie Formánek[1]) bei Tieren (Meerschweinchen) zeigte, schon vor Sättigung des Blutes mit CO ein. Die kleine Verschiebung ist die Ursache des geringen Farbumschlages, der sich in einem rosavioletten Schimmer zeigt. Nach den Spektrophotographien von Rost, Franz u. Heise[2]) liegen Banden bei 570, 542 und 416 $\mu\mu$.

Die Darstellung des Farbstoffes zu den folgenden Untersuchungen geschah auf diese Weise: Frisches Blut wurde mit destilliertem Wasser auf das 120fache verdünnt. Ein Teil dieser Blutlösung wurde in eine Waschflasche gebracht und durch diese eine Stunde lang Leuchtgas, etwa 3—4 Blasen pro Sekunde, durchgetrieben. Man darf wohl annehmen, daß die Lösung danach mit CO gesättigt war. Während des Durchleitens tritt in der Blutlösung eine Koagulation ein. Es setzen sich einige Zeit nach Beendigung des Durchleitens von Gas aus der Lösung rosarote Flöckchen ab. Nachdem die Lösung filtriert ist, erscheint sie im durchfallenden Licht vollständig klar: Die beim Oxyhämoglobin durch Lichthof sich anzeigende Trübung ist verschwunden.

Es wurde nun die O_2–Hb-Lösung, die als Ausgangsmaterial diente, photometriert und ebenso die dargestellte CO–Hb-Lösung. In Tabelle 5 sind die Zahlenwerte der Durchlässigkeitsfaktoren und der dekadischen Absorptionskonstanten für 33 Stellen des Spektrums für beide Lösungen aufgezeichnet. Fig. 4 zeigt die betreffenden Durchlässigkeitsfaktoren in Prozenten als Kurven aufgetragen. Man sieht in der Abbildung deutlich die Verschiebung der Maxima nach dem blauen Ende des Spektrums. Die beiden Banden liegen bei 567,5 $\mu\mu$ und bei 538 $\mu\mu$ (beim O_2–Hb: 575,4 $\mu\mu$ und 541,7 $\mu\mu$). Die Verschiebung ist also nicht gleich stark, die beiden Maxima liegen näher beieinander als beim O_2–Hb, das Minimum daher (als Addition der beiden dort übereinander liegenden Absorptionsbeträge)

[1]) Ztschr. f. anal. Chem. **40**. 520. 1901.
[2]) Arb. d. Kaiserl. Ges.-Amts **30**. 1909.

entsprechend höher. Daß die Banden des CO–Hb etwas schwächer sind, als die zugehörigen des O_2–Hb, rührt wohl von dem durch die Koagulation und Filtration bedingten Verlust an absorbierendem Material her.

Tabelle 5.

Wellenlänge in $\mu\mu$	Oxyhämoglobin		Kohlenoxyhämoglobin	
	α	$D \cdot 100$	α	$D \cdot 100$
645,3	0,02478	94,45	0,0000	100,0
627,3	0,0293	93,4	0,00367	99,20
615,5	0,0400	91,2	0,01374	96,89
604,9	0,06147	86,80	0,03268	92,75
600,0	0,08800	81,66	0,05291	88,53
593,4	0,1650	68,39	0,1015	79,34
584,8	0,5414	28,75	0,2597	54,99
578,4	0,9876	10,29	0,5222	30,05
575,4	1,042	7,868	0,6506	22,35
571,5	0,9685	10,75	0,7901	16,21
569,0	0,8358	14,6	0,8372	14,55
567,5	0,7609	17,03	0,8447	14,3
565,0	0,6880	20,5	0,8301	14,79
560,0	0,6056	24,8	0,7250	18,84
557,5	0,6179	24,10	0,6918	20,35
554,5	0,6787	20,96	0,6787	20,96
551,0	0,7845	16,43	0,7094	19,53
545,0	0,9685	10,75	0,7820	16,52
541,7	1,010	7,93	0,8430	14,35
538,0	1,018	9,60	0,8594	13,82
533,0	0,8240	15,00	0,8122	15,41
527,0	0,6279	23,56	0,6704	21,36
521,0	0,4432	36,04	0,5026	31,43
512,7	0,3598	43,68	0,3600	43,65
505,5	0,3424	45,45	0,3026	49,82
495,4	0,3516	44,50	0,2825	52,19
489,0	0,3788	41,8	0,2825	52,19
477,4	0,4794	33,15	0,3128	48,67
467,8	0,6063	24,75	0,3955	40,24
454,9	0,9155	12,15	0,5288	29,60
446,0	1,497	3,19	0,7352	18,40
438	∞	0,000	0,1156	6,98
432	∞	0,000	∞	0,000

Durchlässigkeitsfaktoren in Prozenten ($D \cdot 100$) und dekadische Absorptionskonstanten (α) von Oxyhämoglobin und Kohlenoxyhämoglobin.

Die Durchlässigkeiten erreichen beim CO–Hb ab 638 $\mu\mu$ nach dem roten Ende hin den Wert 100 %. Auch hier ist die starke Absorptionsbande im Ultraviolett aus dem starken Absorptionsanstieg im Blau zu vermuten.

Das Kohlenoxyhämoglobin zersetzt sich schon nach 5—6 stündigem Stehen langsam, indem Sauerstoff wieder das CO verdrängt.

Auch in vollständig gefüllten und verschlossenen Gefäßen konnte es nicht konstant gehalten werden. Deshalb wurde darauf verzichtet, mehrere durch Verdünnung mit H_2O auseinander hervorgehende Lösungen photometrisch durchzumessen, weil sie sich wegen der Veränderlichkeit des Farbstoffes doch nicht aufeinander beziehen lassen.

3. Hämatoporphyrin.

Das Hämatoporphyrin, symbolisch Hp, entsteht aus dem Oxyhämoglobin durch Abspaltung des eisenhaltigen Teils der Molekel unter Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure. Das Hämatoporphyrin ist mit dem Gallen- und Blattgrünfarbstoff verwandt und bildet so die Brücke zwischen pflanzlichen und tierischen Farbstoffen. Von Nencki[1]) wurde es zuerst beschrieben. Seine Zusammensetzung ist nach H. Fischer[2]):

$$C_{34}H_{38}O_6N_4$$

Die Ausgangssubstanz zu den Lösungen wurde im vorliegenden Falle folgendermaßen hergestellt: 8,75 ccm Blut wurden mit 100 ccm reinster, konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Mischung wird heiß und stößt schwache Chlorwasserstoffdämpfe aus, die vom Kochsalzgehalt des Blutes herrühren. Die kleinen entstehenden Fetzchen und Klümpchen lösen sich nach einem Tag Stehens vollständig auf, so daß eine klare Flüssigkeit erhalten wird. Die Konzentration und Nummer dieser Lösung wurde willkürlich mit 1 bezeichnet. 20 ccm dieser Ursubstanz wurden nun mit zweimal 20 ccm derselben Schwefelsäure verdünnt und diese Lösung mit 2, ihre Konzentration mit $\frac{1}{3} = 3^{-1}$ bezeichnet; davon wurden wieder 20 ccm mit zweimal 20 ccm Schwefelsäure gemischt usw. Die Konzentrationen zweier aufeinanderfolgender Lösungen verhalten sich also wie 1 : 3. Die wirklichen Konzentrationen c können nicht angegeben werden, da ich zu deren Bestimmung nirgends die Vierordsche Konstante $A = \frac{c}{\alpha}$ finden konnte. Die Verdünnung mit konzentrierter Schwefelsäure ist deshalb geboten, weil unter gewissen Bedingungen der Farbstoff im Wasser in amorphen Klümpchen ausfällt. Es wurden insgesamt 6 Lösungen hergestellt. Die ersten sind prachtvoll purpurrot; je verdünnter sie sind, desto mehr gehen sie gegen Rotgrün. Die Verdünnung geschah mit

[1]) Arch. f. exp. Path. **24**. 442. 1900.

[2]) Oppenh. Handb. d. Biochem. **1**. 359. 1924.

einer 20 ccm Pipette normal bei 15°. Der Verdünnungsfehler ist höchstens 0,15 % da für ausgeglichene Temperatur gesorgt wurde.

Es entstand folgende Reihe von Konzentrationen.

Nr.	Konzentr.						
1	3^{0}	0,0875	ccm	Blut	pro	ccm	Lösung
2	3^{-1}	0,02916	„	„	„	„	„
3	3^{-2}	0,00972	„	„	„	„	„
4	3^{-3}	0,00324	„	„	„	„	„
5	3^{-4}	0,00108	„	„	„	„	„
6	3^{-5}	0,00036	„	„	„	„	„

Besondere Mühe machte hier die Herstellung von haltbaren Trögen, da mehrere verwendete Kitte der zerstörenden Wirkung

Tabelle 6.

Wellenlänge in $\mu\mu$	Nr. 1	2	3	4	5	6
667,0	1,426	$0,4998$	0,2014	0,08661	0,03580	0,01785
660,0	1,585	$0,5266$	0,2048	0,0888	0,0374	0,0182
651,0	1,733	$0,5784$	0,2084	0,09017	0,0379	0,01905
645,0	1,824	$0,6468$	0,2236	0,0926	0,0385	0,0200
636,5	2,068	$0,7168$	0,2494	0,1003	0,0399	0,02249
630,0	2,097	$0,8240$	0,2793	0,1120	0,0434	0,0215
622,5	∞	$0,9923$	0,3423	0,1321	0,0486	0,02155
613,0	—	1,319	0,4407	0,1649	0,0583	0,0273
604,9	—	1,733	0,5983	0,2117	0,0736	0,0350
602,5	—	$1,872$	0,6303	0,2212	0,08119	0,03690
599,0	—	1,854	0,6498	0,2308	0,0846	0,0364
595,5	—	$1,876$	0,6394	0,2235	0,0822	0,03534
592,0	—	1,789	0,6089	0,2172	0,07682	0,03433
590,0	—	1,769	0,5985	0,2168	0,0746	0,0348
587,0	—	$1,820$	0,6089	0,2217	0,07815	0,0356
583,0	—	1,954	0,6617	0,2378	0,0862	0,03791
577,0	—	$2,222$	0,7448	0,2695	0,0962	0,0412
571,5	—	$2,592$	0,8537	0,3019	0,1065	0,04663
560,0	—	∞	1,284	0,4320	0,1509	0,0575
557,5	—	—	1,338	0,4582	0,1598	0,05892
552,0	—	∞	1,276	0,4331	0,1459	0,05636
543,4	—	$2,700$	0,9065	0,2973	0,1011	0,04613
535,0	—	1,824	0,6537	0,2323	0,08424	0,03690
527,0	—	1,794	0,6067	0,2235	0,0813	0,0345
521,0	—	1,747	0,6000	0,2208	0,08133	0,03433
512,7	—	1,719	0,5935	0,2200	0,08133	0,03386
499,0	—	1,756	0,6053	0,2265	0,08169	0,0386
486,5	—	1,897	0,6417	0,2368	0,0940	0,0460
475,0	—	2,149	0,7461	0,2610	0,1105	0,0580
464,9	—	∞	0,9295	0,3100	0,1345	0,0730
454,9	—	—	1,1730	0,4357	0,1635	0,0940
446,0	—	—	1,70	0,6580	0,2096	0,119
438,0	∞	∞	∞	1,051	0,3759	0,149

Hämatoporphyrin (sauer): Dekadische Absorptionskonstanten (α).

der konzentrierten Schwefelsäure nicht standzuhalten vermochten. Endlich gelang es, mit reinem Paraffin Glaströge, von denen der das absorbierende Medium enthaltende an den beiden Durchtrittsstellen des Lichtes einen Durchmesser von 1,005 cm hatte, zusammenzukitten, welche nicht angegriffen wurden, jedoch wegen der leichten Deformierbarkeit des Bindemittels sorgfältig behandelt werden mußten. Das Glas muß zum Kitten mit Paraffin gut trocken sein, da sonst die Schwefelsäure zwischen Glas und Kitt eindringt und dann die Gefäße auseinanderfallen. Am besten überzieht man die Tröge außen und innen mit einer dünnen Haut von Paraffin und läßt nur zwei gegenüberliegende Stellen frei, welche dem Lichtbündel gerade eben den Durchtritt gestatten. Das Glas darf dazu

Tabelle 7.

Wellenlängen in $\mu\mu$	Nr. 1	2	3	4	5	6
667,0	3,75	31,64	62,89	81,92	92,09	95,97
660,0	2,60	29,75	62,40	81,50	91,80	95,90
651,5	1,85	26,40	61,89	81,25	91,65	95,51
645,0	1,50	22,65	59,80	80,80	91,60	95,50
636,5	0,856	19,20	56,30	79,38	91,22	94,95
630,0	0,80	15,00	52,60	77,35	90,50	95,20
622,5	0,000	10,18	45,47	73,77	89,41	95,16
613,0	—	4,80	36,25	68,41	87,44	93,90
604,9	—	1,85	25,22	61,42	84,42	92,25
602,5	—	1,34	23,44	60,09	82,95	91,85
599,0	—	1,40	22,40	58,80	82,50	92,00
595,5	—	1,33	22,94	59,80	82,75	92,18
592,0	—	1,63	24,61	60,65	83,79	92,40
590,0	—	1,70	25,20	60,75	84,25	92,30
587,0	—	1,51	24,61	60,02	83,53	92,15
583,0	—	1,11	21,79	57,84	82,40	91,64
577,0	—	0,600	18,0	53,8	80,2	91,0
571,5	—	0,256	14,01	49,90	78,25	89,82
560,0	—	0,000	5,20	37,00	70,64	87,60
557,5	—	—	4,60	34,82	69,25	87,31
552,0	—	0,000	5,29	36,89	71,47	87,83
543,4	—	0,200	12,4	50,43	79,23	89,92
535,0	—	1,50	22,2	58,58	82,37	91,85
527,0	—	1,61	24,73	59,8	83,0	92,4
521,0	—	1,79	25,12	60,2	82,92	92,40
512,7	—	1,91	25,50	60,3	82,92	92,50
499,0	—	1,75	24,8	59,4	82,85	91,5
486,5	—	1,27	22,82	57,97	80,5	90,0
475,0	—	0,71	17,94	54,83	77,6	87,5
464,9	—	0,000	11,76	49,0	73,4	84,5
454,9	—	—	6,71	36,67	68,62	80,5
446,0	—	—	1,99	21,98	61,7	76
438,0	0,000	0,000	0,00	8,90	42,08	71

Hämatoporphyrin (sauer): Durchlässigkeitsfaktoren in Prozenten.

nicht warm gemacht werden, da sich sonst das Paraffin über die ganze Oberfläche rasch ausbreitet. Am besten nimmt man ein Stück ziemlich dicken Kupferdrahtes, das erhitzt wird und als „Lötkolben" dient.

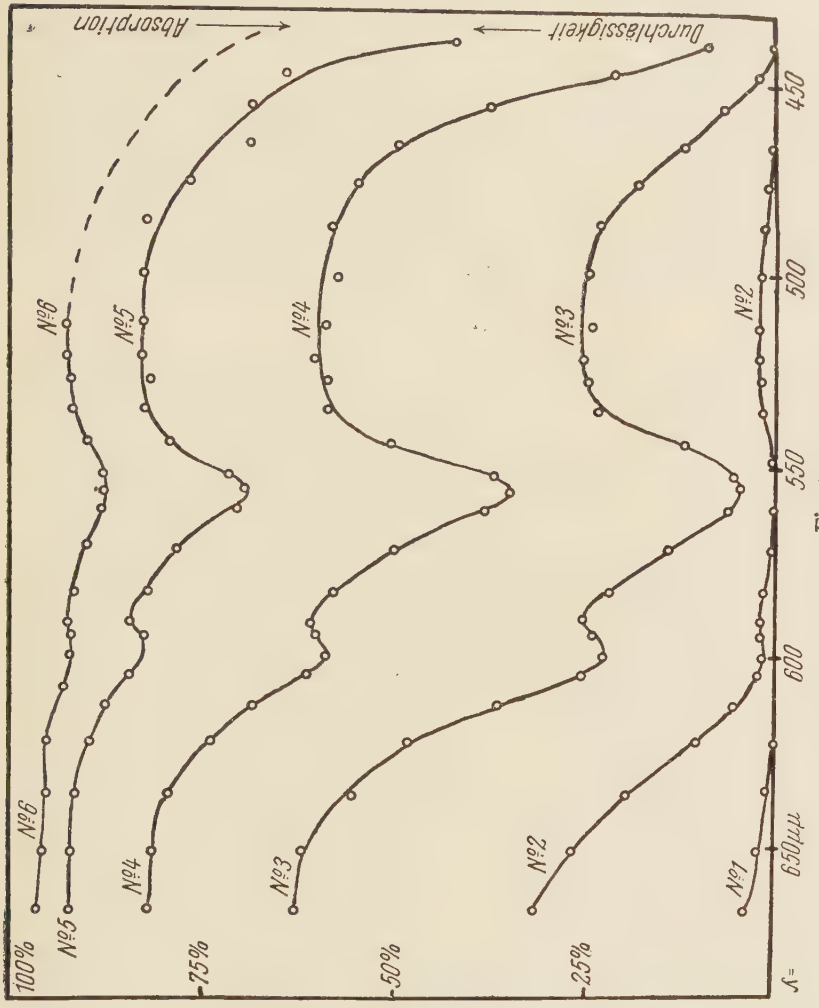

Fig. 5.
Hämatoporphyrin (sauer): Durchlässigkeit in Prozenten.

Die Hämatoporphyrinpräparate wurden alle am 22. 7. 1924 hergestellt. Konzentration 3^0, 3^{-1}, 3^{-2} wurden am 24. 7., 3^{-3} und 3^{-4} am 26. 7., Konzentration 3^{-5} am 31. 7. photometriert. Auch hier wurde vor den immer gleichen Spalt das Absorptionsmedium, vor dem andern ein Trog mit konzentrierter reiner Schwefelsäure

gestellt. Die Ergebnisse der Messungen sind in den Tabellen 6 und 7 für 33 Punkte des Spektrums aufgeführt. Tab. 6 enthält die dekadischen Absorptionskonstanten, Tab. 7 die zugehörigen Durchlässigkeitsfaktoren in Prozenten. Fig. 5 stellt die letzteren für alle 6 Konzentrationen als Kurven dar. Das Bild zeigt die zwei an Intensität verschiedenen Maxima. Das schwächere liegt bei 599 $\mu\mu$, das stärkere bei 557,5 $\mu\mu$. (Formánek[1]): 604,5—599 $\mu\mu$, 568—553 $\mu\mu$; je nach Herstellung verschieden). Endlich ist auch hier wieder ein sehr starkes Maximum im Ultravioletten durch den Anstieg im Blau gekennzeichnet. Das starke Zurückgehen der beiden erstgenannten Bänder beim Verdünnen, während jenes im Violett noch stark bleibt, erklärt das Auftreten des rotgrünen Tones bei den verdünnten Lösungen, ähnlich wie bei den dichroitischen Kristallen.

4. Methämoglobin.

Läßt man Blut einige Tage stehen, so wird seine Farbe dunkler, bis sie schließlich ins Kaffeebraune übergeht. Deutlicher sieht man das bei Blutflecken auf hellen Stoffen. Der neu entstehende Farbstoff im alternden Blut ist das Methämoglobin, symbolisch Methb. Es entsteht auch in kürzerer Zeit durch Einwirkung vieler Gifte auf den Körper, z. B. gewisser Chinoline, der Nitro-Aniline usw. Sehr schnell läßt sich das Methämoglobin durch Auflösen eines kleinen Kristalls Ferrizyankalium in einer Blutlösung darstellen. Der Umschlag erfolgt fast augenblicklich. Jedoch wirkt das stark färbende Blutlaugensalz störend auf die Photometrie der auf diesem Weg hergestellten Lösungen, weil dadurch die Absorption besonders im Blau viel stärker wird.

Der Entdecker des Methämoglobins war Hoppe-Seyler.[2]) Das Methämoglobin hat die gleiche Zusammensetzung wie das O_2–Hb, enthält aber den Sauerstoff in anderer Bindung. Das wissen wir durch die Arbeiten von A. Gamgee[3]), G. Hüfner[4]), A. Jäderholm.[5])

Bei der Untersuchung dieses Farbstoffes wurden die beiden Eintrittspalten des Photometers auf 0,250 mm gestellt. Der Okularspalt blieb unverändert auf 0,14 mm.

---

[1]) Ztschr. f. anal. Chem. **40**. 515. 1901.
[2]) Zentralbl. Med. Wiss., S. 834. 1864.
[3]) Phil. Trans. Roy. Lond. **158**. 589. 1868.
[4]) Ztschr. phys. Chem. **7**. 65. 1882 und **8**. 366. 1884.
[5]) Ztschr. f. Biol. **16**. 1. 1880.

Extrahiert man alte Blutflecken an Kleiderstoffen und untersucht das Absorptionsspektrum der erhaltenen Lösungen, so bemerkt man zu den zwei Streifen des O_2–Hb noch zwei neue, einen schwächeren im Rot bei 627 $\mu\mu$, einen stärkeren bei 499 $\mu\mu$. (Formánek[1]): 634 $\mu\mu$ und 500,8 $\mu\mu$.) Es ist schwierig, die beiden Maxima genau zu bestimmen, da sie bei weitem nicht so scharf sind, wie die des O_2–Hb und weil das Band bei 499 $\mu\mu$ in einem Gebiet liegt, wo für das König-Martenssche Photometer keine sehr gute Empfindlichkeit herrscht. Ist das Blut bloß einige Tage alt, so sind die beiden Streifen des Methämoglobins schwach, die des Oxyhämoglobins stark. Ist das Blut älter, so werden die Banden des Methämoglobins immer stärker, die des Oxyhämoglobins immer schwächer. Es muß also eine Umwandlung des einen Farbstoffes in den andern vorliegen. Man nimmt an, daß sich der Sauerstoff, welcher beim O_2–Hb (ähnlich wie bei einem Peroxyd:) $Hb\begin{cases} O^{2)} \\ | \\ O \end{cases}$ gebunden gedacht wird, in die festere Bindung $Hb\begin{cases} O^{6)} \\ O \end{cases}$ übergeht.

Die Figur 6 gibt die Entwicklung des einen Spektrums in das andere bei mehreren Blutlösungen, welche durch Extraktion von Blutflecken verschiedenen Alters auf Leinwand gewonnen wurden. Es sind Blutflecken von 7, 13 und 25 Tagen Alter extrahiert und photometriert. Am roten Ende des Spektrums sind jeweils kleine Stücke der Bezugsachsen gezeichnet, weil die Kurven zur besseren Übersicht vertikal verschoben sind. Man erkennt das Wachsen der Methämoglobin- und das Schwinden der Oxyhämoglobinbanden. Bei der sieben Tage alten Lösung sind die O_2–Hb-Banden noch groß, die des Methämoglobins noch klein. Bei dreizehn Tagen ist das Band im Blau des Methämoglobins bereits größer als das O_2–Hb-Band. Die vier Bänder wachsen und verschwinden anscheinend nicht gleichmäßig. Die O_2–Hb-Bänder sind durch Überlagerung mit den Methämoglobin-Banden an Intensität verschieden geworden. Nach 25 Tagen sind die beiden Streifen des O_2–Hb nurmehr kleine „Wellen" in der Intensitätskurve. Die Kurven der Fig. 6 sind alle etwas verzerrt, weil die Ordinaten nur der Quadratwurzel aus der Durchlässigkeit proportional sind. Ferner ist zu bemerken, daß die Lösungen wegen der kleinen extrahierten Mengen

[1]) Ztschr. f. anal. Chem. **40**. 508. 1901.

[2]) K. Bürker in Tiegerstedts Handb. d. phys. Meth. **2** (1). 71. 1911.

an Konzentration bis zu 10 % verschieden sein können. Die Kurven der Fig. 6 wären vielleicht zu einer Methode der Altersbestimmung von Blut zu gebrauchen; denn es ist anzunehmen, daß zwischen der Menge der beiden Farbstoffe, also zwischen der Stärke ihrer

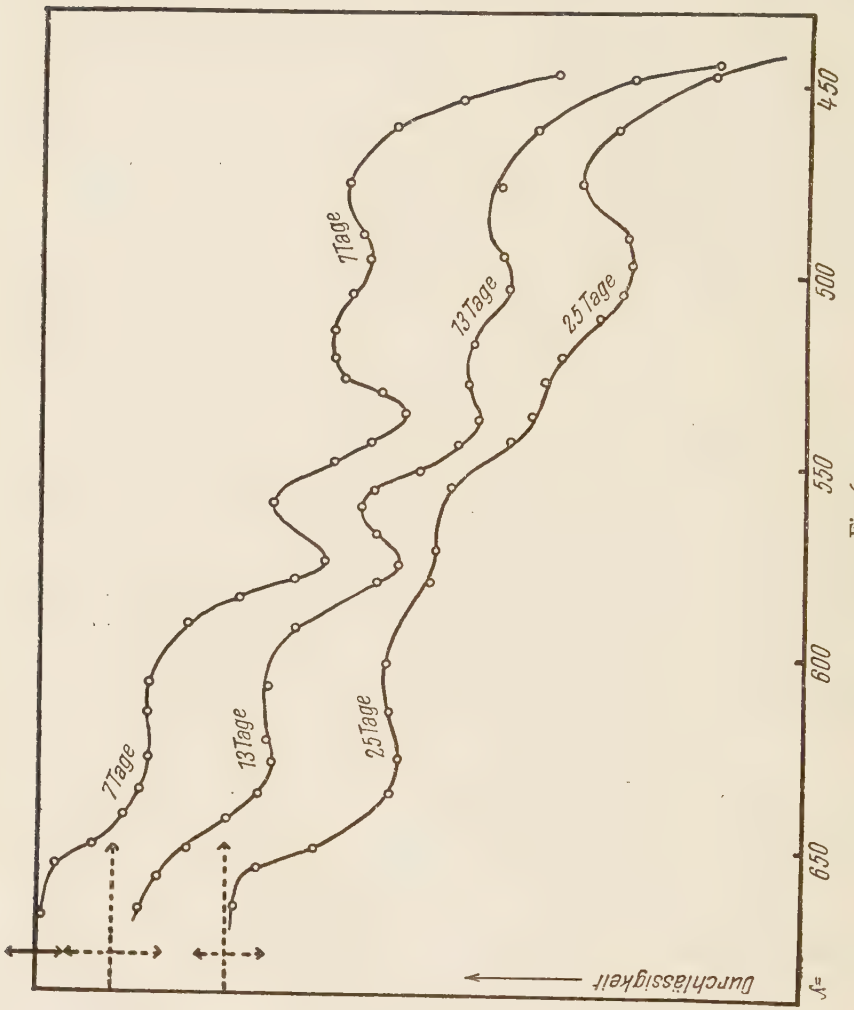

Fig. 6.
Entwicklung von Methämoglobin in Oxyhämoglobinlösungen.

Absorptionsbanden, von der Zeit (vielleicht auch noch von andern Umständen) abhängige Gleichgewichtsbedingungen herrschen. Das Verhältnis der dekadischen Absorptionskonstanten der Maxima des Methämoglobins zu denen der Maxima des O_2–Hb muß eine Zeitfunktion sein. Zu ihrer Bestimmung wurden die Streifen bei

627 $\mu\mu$ und 575,4 $\mu\mu$ gewählt, wegen der guten Empfindlichkeit des Auges für diese Spektralgegenden. Auf Grund verschiedener Experimente wurde auch eine solche Zeitfunktion gefunden, aber ihre Reproduktion läßt, wie gleich zu Annfang gesagt sein soll, zu wünschen übrig. Sie kann deshalb nur das Prinzip zu einer Methode zur Altersbestimmung des Blutes darstellen. Im folgenden sei diese Methode an Hand der Experimente, welche angestellt wurden, etwas näher beschrieben.

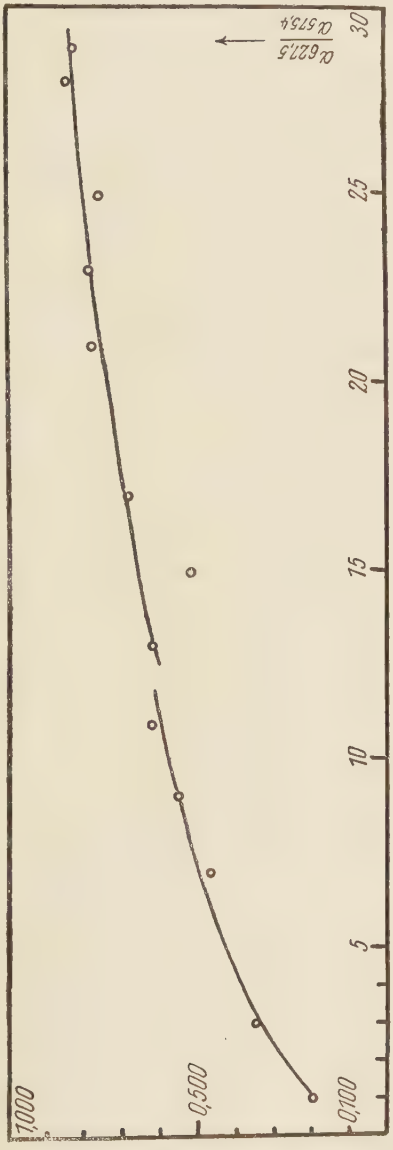

Fig. 7.
Kurve zur Bestimmung des Alters von Blutflecken.

Am 19. 8. 1924 wurden eine Anzahl von etwa handgroßen Baumwoll-Läppchen (Serie 1) mit je 1 ccm frischem Blut betropft und im Laboratorium, wo ziemlich gleichmäßige Temperatur herrschte, an Drähten frei aufgehängt. Am 2. 9. wurde eine weitere Serie 2 solcher Läppchen hergestellt. Von Serie 1 wurde nun je ein Stück nach 13, 15, 17, 21, 23, 25, 28, 29 Tagen untersucht; von Serie 2 je ein Stück nach 1, 3, 7, 9, 11 Tagen. Zu diesem Zweck wurde je ein Läppchen in 100 ccm destilliertem Wasser extrahiert, die jüngeren eine halbe Stunde bis zu den ältesten zweieinhalb Stunden und hier und da mit einem Glasstab gerührt. Nach dieser Zeit hatte sich sämtlicher Farbstoff im Wasser aufgelöst. Die Lösungen wurden darauf noch filtriert und dann photo-

metriert. Sodann wurden die α, d. h. die dekadischen Absorptionskonstanten, für die Stellen 627 $\mu\mu$ und 575,4 $\mu\mu$ gerechnet und die Quotienten $\frac{\alpha_{627}}{\alpha_{575,4}}$ gebildet und als Funktionen der Zeit aufgetragen. Die Zeit: ein Tag wurde als Einheit der Abszissenachse benützt. Fig. 7 gibt ein Bild der von Serie 1 und 2 erhaltenen zwei Kurvenstücke, welche sich ziemlich gut aneinander anschließen. Das erste von links, von Abszisse 1—11, gehört zu Serie 2, das von 13—29 zu Serie 1. Fig. 7 zeigt, daß offenbar der Umwandlung der Farbstoffe ineinander ein ganz bestimmtes Zeitgesetz zugrunde liegt. Die Bedingungen, unter welchen in diesem Fall der Prozeß vor sich ging, sind allerdings möglichst konstant gehalten: Aufhängen in einem Zimmer des Laboratoriums, gleiche Temperatur, Beleuchtung, Lüftung usw. Die aus Kurve 7 interpolierten Werte für die $\frac{\alpha_{627}}{\alpha_{575,4}}$ der einzelnen Tage, die das Blut alt ist, sind in folgender Tabelle festgelegt:

Tabelle 8.

Alter in Tagen	$\frac{\alpha_{627}}{\alpha_{575,4}}$	Alter in Tagen	$\frac{\alpha_{627}}{\alpha_{575,4}}$	Alter in Tagen	$\frac{\alpha_{627}}{\alpha_{575,4}}$
1	0,19	11	0,59	21	0,76
2	0,27	12	0,60	22	0,77
3	0,33	13	0,62	22	0,79
4	0,38	14	0,63	24	0,80
5	0,42	15	0,66	25	0,81
6	0,45	16	0,67	26	0,82
7	0,49	17	0,70	27	0,83
8	0,52	18	0,71	28	0,84
9	0,55	19	0,73	29	0,85
10	0,57	20	0,75		

Eine weitere Reihe von Versuchen unter anderen Bedingungen (Aufhängen der Läppchen im Garten, in einem Vestibül mit inkonstanter Temperatur usw.) gaben aber durchaus keine gute Übereinstimmung mit vorigem Ergebnis.

Es kann sich bei der Umwandlung der Farbstoffe nur um zwei Dinge, welche einzeln oder zusammen wirken, handeln:

1. Innere Molekularumwandlung der Konstitution ohne äußere Einflüsse,

2. Umwandlung rein nur durch Einwirkung von außen, z. B. durch Licht, Gase, Temperatur.

Um diese beiden Umstände zu untersuchen, wurden mit Blut befleckte weiße Leinenstückchen in mit Paraffin verschlossene Glas-

röhren gebracht. Vier dieser Gefäße wurden mit Wasserstoff, welcher elektrolytisch hergestellt war, gefüllt; vier mit Sauerstoff aus einer Bombe. Ferner wurden noch vier unverschlossen gelassene Läppchen präpariert. Die Hälfte aller genannten Präparate wurden in völlige Dunkelheit gebracht, die andere Hälfte an ein Fenster mit nordöstlicher Lage gelegt. Nach 17 Tagen wurden sämtliche Läppchen extrahiert und dann die Lösungen photometriert. Die Ergebnisse lassen sich nicht eindeutig zusammenfassen, weil der Versuche offenbar zu wenig waren. Aber es scheint doch sicher zu sein, daß die Beleuchtung keinen Einfluß hat. Das ging auch aus folgendem hervor.

10 Leinen und 10 Baumwollstreifen (weiß, wie alle verwendeten Stoffe) wurden mit Blut betropft, die Hälfte in vollkommene Dunkelheit, die andere Hälfte an ein Fenster mit Ostrichtung gehängt. Nach dem Messen ergab sich, daß die Stoffart und Belichtung keinen merkbaren Einfluß hatte. Wohl aber scheint es nicht gleichgültig zu sein, wie die Verteilung des Blutes ist; ob man es auf eine einzige Stelle getropft hat, so daß ein kräftig benetzter Fleck entstand, oder ob man es in kleinen Tröpfchen, welche voneinander durch unbenetztes Tuch getrennt sind, über das ganze Läppchen verspritzte. Die Temperatur spielt anscheinend auch eine Rolle, wurde aber gar nicht weiter verfolgt.

Um Eindeutigkeit und volle Kenntnis zu erreichen und so der Gerichtsmedizin nützlich zu sein, muß hier eine eingehende Einzeluntersuchung einsetzen, welche aber außerhalb des Rahmens dieser Arbeit liegt. Eine langdauernde, systematische Untersuchung über die Verwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin wäre nötig, um die Einflüsse des Lichts, der Temperatur, der Verteilung, der Gase, der Feuchtigkeit zu studieren. Je weniger Faktoren außer der Zeit mitspielen, desto besser wäre es für die Ausarbeitung einer Methode in dieser Richtung, da bei Gerichtsfällen die wenigsten Bedingungen kontrolliert werden können. Es wäre aber neben der Immunitätsforschung wohl noch diese physikalische Methode zu wünschen: jene gibt die Blutart, diese das Blutalter. Zur weiteren Festlegung einer Zeitfunktion könnten natürlich auch noch die anderen Verhältnisse heranzogen werden, welche sich aus den vier dekadischen Absorptionskonstanten der Maxima bilden lassen, um z. B. vier verschiedene Kurven zu erhalten, die sämtlich der Zeitbestimmung dienen könnten.

5. Prüfung des Beerschen Gesetzes.

Ist J die Stärke eines Lichtstromes, so erleidet dieser im absorbierenden Medium auf der Strecke dx den Verlust

$$-dJ = k \cdot J \cdot dx.$$

k, die Absorptionskonstante, ist vom Medium und von der Wellenlänge abhängig. Ändert sich auf der Strecke d die Anfangsstärke J in J_1, so gilt

$$-\int_{J}^{J_1} \frac{dJ}{J} = k \int_{0}^{d} dx$$

woraus:

$$\text{lognat } J - \text{lognat } J_1 = k \cdot d$$

oder

$$J_1 = J e^{-kd}$$

oder

$$J_1 = J \cdot 10^{-ad}.$$

Dieser Ausdruck ist das Lambertsche Gesetz. Für Lösungen erhält man auf ähnliche Weise die Abhängigkeit von Konzentration c und Schichtdicke d durch das allgemeinere Beersche Gesetz

$$J_1 = J \cdot 10^{-adc}.$$

Daraus folgt für die gleiche Schichtdicke d (also gleiche Tröge):

$$\frac{\alpha_1}{\alpha_2} = \frac{c_1}{c_2}.$$

Die dekadischen Absorptionskonstanten müssen sich also wie die Konzentrationen verhalten.

Bei den beschriebenen Untersuchungen des Oxyhämoglobins verhalten sich zwei aufeinander folgende Konzentrationen wie 2 : 1, beim Hämatoporphyrin wie 3 : 1. Es müßte also sein im ersten Fall:

$$\frac{\alpha_1}{\alpha_2} = \frac{\alpha_2}{c_3} = \frac{\alpha_4}{\alpha_4} = \ldots \frac{\alpha_{n-1}}{\alpha_n} = 2$$

und im zweiten Fall:

$$\frac{\alpha_1}{\alpha_2} = \ldots \frac{\alpha_{n-1}}{\alpha_n} = 3.$$

Über die Gültigkeit und Berechtigung des Beerschen Gesetzes ist im dritten Band des Kayserschen Handbuches der Spektrokopie umfangreich diskutiert, und es wurde deshalb seine Anwendung auf die vorliegenden Messungen untersucht. Aus den Tabellen wurden die Quotienten der dekadischen Absorptionskonstanten gebildet, und zwar so, daß aus Tabelle 1 für jede Wellenlänge zwei

Tabelle 9.

Prüfung des Beerschen Gesetzes bei O_2–Hb.

Wellenlänge in $\mu\mu$	$2^{-1}/2^{-2}$	$2^{-4}/2^{-5}$	$2^{-6}/2^{-7}$	$2^{-8}/2^{-9}$	$2^{-11}/2^{-12}$	Farbmittel
683,0	1,49	1,83	1,57	1,42	1,92	
674,9	1,54	1,84	—	—	—	
665,0	1,49	1,85	1,57	—	—	
657,5	1,52	1,84	1,54	—	—	
651,5	1,46	1,91	1,52	—	—	
645,3	1,46	1,86	1,55	—	—	1,69
636,5	1,54	1,86	1,55	1,42	—	
627,3	1,54	1,84	1,60	1,54	—	
621,0	1,41	1,82	1,66	1,68	—	
615,5	1,60	1,80	1,72	1,94	—	
610,5	1,66	1,81	1,76	1,92	1,92	
Rot (Mittel)	1,52	1,84	1,60	1,55	1,92	
604,9	1,66	1,88	1,179	1,93	1,92	
600,0		1,93	1,67	2,01	1,88	
597,0		1,96	1,52	1,94	1,46	
593,4		1,82	1,84	2,01	1,60	1,86
584,8				2,41	2,17	
578,4			1,97	2,01	2,44	
575,4			1,99	2,02	2,26	
572,8			1,97	2,02	2,31	
Gelb (Mittel)	1,66	1,90	1,74	2,04	2,00	
567,5			1,98	2,08	2,18	
562,8			1,98	2,03	1,99	
560,0			1,99	2,01	1,92	
555,9			1,98	2,02	2,03	
551,0			1,99	2,02	2,41	
545,1			2,02	1,93	2,38	
541,7			2,01	2,02	2,43	2,04
538,4			2,01	2,00	2,39	
532,0			1,90	2,00	1,96	
527,0			1,97	1,95	2,06	
521,0			1,98	1,99	2,07	
517,9			1,94	2,00	2,12	
512,7			1,95	1,99	2,08	
Grün (Mittel)			1,98	2,00	2,15	
505,5			1,95	2,08		
502,0			1,94	2,06		
495,4			1,95	2,15		
489,0			1,96	2,08		2,01
483,0			1,97	2,06		
477,4			1,99	2,06		
472,0			1,96	2,03		
464,9			1,96	2,02		
Blau (Mittel)			1,96	2,06		
460,0			1,95	2,06		
454,9			1,95	1,98		1,97
446,0				1,86		
438,0				2,02		
Violett (Mittel)			1,95	1,98		
Mittel	1,53	1,86	1,81	1,90	2,02	

$\frac{\alpha_{i-1}}{\alpha_i}$ = constans (α = dekadische Absorptionskonstante). — Gesamtmittel 1,88.

Tabelle 10.

Prüfung des Beerschen Gesetzes bei Hämatoporphyrin.

Wellenlänge in $\mu\mu$	Nr. 1/Nr. 2	Nr. 2/Nr. 3	Nr. 3/Nr. 4	Nr. 4/Nr. 5	Nr. 5/Nr. 6	Farbmittel
667,0	2,85	2,48	2,32	2,42	2,00	2,52
660,0	3,01	2,57	2,31	2,37	2,03	
651,5	3,00	2,77	2,31	2,37	1,90	
645,0	2,82	2,89	2,41	2,13	1,92	
636,5	2,89	2,87	2,42	2,52	1,77	
630,0	2,55	2,94	2,49	2,58	2,02	
622,5		2,89	2,59	2,72	2,25	
613,0		2,99	2,68	2,83	2,14	
Rot (Mittel)	2,85	2,80	2,44	2,49	2,02	
604,9		2,89	2,83	2,87	2,10	2,70
602,5		2,97	2,85	2,73	2,19	
599,0		2,85	2,81	2,73	2,32	
595,5		2,93	2,86	2,72	2,33	
592,0		2,94	2,80	2,83	2,24	
590,0		2,95	2,76	2,91	1,95	
587,0		2,98	2,74	2,84	2,19	
583,0		2,96	2,78	2,76	2,27	
577,0		2,98	2,76	2,80	2,33	
571,5		3,03	2,82	2,84	2,29	
Gelb (Mittel)		2,95	2,80	2,80	2,22	
560,0			2,97	2,86	2,62	2,75
557,5			2,92	2,86	2,71	
552,0			2,94	2,97	2,59	
543,4		2,98	3,05	2,94	2,49	
535,0		2,79	2,81	2,76	2,02	
527,0		2,96	2,72	2,75	2,35	
521,0		2,91	2,72	2,71	2,36	
512,7		2,90	2,69	2,70	2,40	
Grün (Mittel)		2,91	2,85	2,82	2,44	
499,0		2,90	2,67	2,77		2,71
486,5		2,96	2,70	2,52		
475,0		2,88	2,85	2,36		
464,9			2,65	2,30		
(Blau (Mittel)		2,91	2,72	2,49		
454,9			2,69	2,66		2,77
446,0			2,58	3,14		
438,0				2,79		
Violett(Mittel)			2,64	2,86		
	2,85	2,88	2,70	2,70	2,22	

$\frac{\alpha_{i\ 1}}{\alpha_i}$ = const. (α = dekadische Absorptionskonstante).

Gesamtmittel 2,67.

Zahlen derjenigen Seite 103 genannten Konzentrationen genommen wurden, welche sich wie 1 : 2 verhielten. Aus Tabelle 6 konnten sämtliche Konzentrationen benutzt werden, da ja immer eine aus

der andern durch Verdünnen hervorging. In den Tabellen 9 und 10 sind diese Quotienten eingetragen. Die erste Spalte gibt jeweils die Wellenlängen in Mikromillimeter, die folgenden die $\frac{\alpha_{i-1}}{\alpha_i}$, die letzte die Gesamtmittel der Quotienten der ungefähr nach den Farben Rot, Gelb, Grün, Blau, Violett gebildeten und durch Querstriche getrennten Spektralbezirke. Die mit Rot, Gelb usw. bezeichneten Querspalten geben die Mittel der zugehörigen Farbenbezirke der senkrechten Spalten. Die unterste Querspalte gibt die Gesamtmittel der Einzelspalten, also über das ganze sichtbare Spektrum. Das Gesamtmittel der Tabelle 9 (Oxyhämoglobin) ist 1,88 (anstatt 2), das der Tabelle 10 (Hämatoporphyrin) ist 2,67 (anstatt 3), das gibt eine bzw. Unstimmigkeit von 6 bzw. 11 %, während die Beobachtungsfehler im Durchschnitt nicht über 1 % gehen.

Aber diese Gesamtmittel geben aus verschiedenen Gründen (wie ein Gesamtfehler) kein übersichtliches Bild:

1. Es haben in verschiedenen Farben wegen des Ganges des Beobachtungsfehlers die Einzelmessungen verschiedenes Gewicht;

2. sind Zahlen aus den Bezirken geringer und starker Absorption nicht als gleichwertig zu betrachten;

3. läßt sich ein Gang der Quotienten auf diese Art nicht zeigen.

Deshalb wurden ausführlich die Einzelresultate und Teilmittel der Tabellen 9 und 10 gegeben.

Die Abweichungen von 6 bzw. 11 % können aus drei Gründen zu erklären sein:

1. Beobachtungsfehler;

2. Veränderung des Farbstoffes mit wechselnder Konzentration (z. B. Dissoziation);

3. Nicht allgemeine Gültigkeit des Beerschen Gesetzes.

Zur Wertung dieser drei Gründe ist folgendes zu sagen: Der Beobachtungsfehler könnte vielleicht infolge von Temperatureinflüssen oder sonstigen nicht genau gleichzuhaltenden Bedingungen etwas größer sein, aber erreicht gewiß nicht 6 oder gar 11 %. Denkbar wäre einzig Fall 2 und 3. Eine Entscheidung zwischen diesen kann bei einem so kompliziert gebauten Molekel, wie bei dem des O_2–Hb und der damit verbundenen großen Möglichkeit der Veränderung, nicht leicht gewagt werden. Doch hat Fall 3 gewisse Gründe für sich: Im Rot sind die kleinsten Werte der Quotienten und also die größten Abweichungen vom Beerschen Gesetz; sie steigen und

erreichen im Gebiet starker Absorption die besten Werte, fallen dann wieder gegen Blau etwas, was aber gut mit dem dortigen großen Beobachtungsfehler erklärt sein mag, also ohne Bedeutung ist. Der kleine Wert für die Gebiete geringer Absorption ist auffällig. In solchen Gebieten ist zuerst eine Unstimmigkeit des Beerschen Gesetzes zu erwarten, da es ja als „Molekulargesetz" mit großer Zahl von absorbierenden Individuen rechnet, und geringe Absorption ja ungefähr gleichwertig mit kleiner Anzahl von Molekeln ist. Die Durchschnittswerte der einzelnen Konzentrationen wachsen beim O_2–Hb mit der Verdünnung, beim Hp fallen sie. Dieser Umstand jedoch kann sowohl für den Molekelzerfall, als auch gegen das Beersche Gesetz sprechen.

Ein weiterer, vorerst nicht zu kontrollierender Einfluß könnte auch von der Zerstreuung des Lichtes durch große Molekelkomplexe herrühren, welche sich in den wahrscheinlich wagrechten roten Enden der Absorptionskurven von O_2–Hb kenntlich macht. Möglich, daß dieser Zerstreuungsverlust, welchen ich einfach als Absorption verrechnete, nicht nach dem *e*-Gesetz geht. Jedenfalls kann eine Entscheidung hier so lange nicht gefällt werden, bis man genaueste Kenntnis des Blutfarbstoffmolekels besitzt.

6. Zusammenfassung.

I. Es wird die quantitative spektrophotometrische Ausmessung in Zahlen und Abbildungen gegeben von:

1. einerer wäßrigen Oxyhämoglobin- bzw. Blutlösung in 12 Konzentrationen an 33 Stellen des sichtbaren Spektrums;

2. einer 45 Minuten auf 6200 Touren zentrifugierten, wäßrigen Blutlösung und derselben vor Zentrifugieren an 26 Stellen des Spektrums;

3. einer wäßrigen Kohlenoxydhämoglobinlösung und der entsprechenden Oxyhämoglobin- bzw. Blutlösung an 33 Stellen;

4. einer Hämatoporphyrinlösung in konzentrierter, reinster Schwefelsäure in 6 Konzentrationen an 33 Stellen des Spektrums.

II. Es wird die Größe des Beobachtungsfehlers und seine Abhängigkeit von Absorption, Intensität und Wellenlänge beim Photometrieren mit einem König-Martensschen Spektralphotometer studiert an Hand einer Fehlerkurve der spektralphotometrischen Beobachtung einer Oxyhämoglobin-Absorptionskurve.

III. Es wird das Prinzip einer noch näher zu studierenden spektralphotometrischen Methode zur Feststellung des Alters von

Blutflecken auf Kleiderstoffen angegeben, beruhend auf der Umwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin.

IV. Die Prüfung des Beerschen Gesetzes an den dekadischen Absorptionskonstanten der unter I., 1. genannten Oxyhämoglobin- und der Hämatoporphyrinlösungen unter I., 4. ergibt 6 bzw. 11 % Abweichungen; und zwar absorbieren beim Oxyhämoglobin die verdünnteren Lösungen mehr, als zu erwarten, nähern sich aber, mit Verdünnung fortschreitend, immer mehr dem theoretischen Wert und überschreiten bei den verdünntesten (1 : 4000) Lösungen diesen um ein Geringes, beim sauren Hämatoporphyrin absorbieren die verdünnten Lösungen ebenfalls mehr als zu erwarten, aber der gemessene Wert weicht mit fortschreitender Verdünnung immer mehr vom theoretischen Wert ab.

Zum Schlusse sei es mir erlaubt, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Aug. Hagenbach, für die Anregung zu dieser Arbeit, für das Interesse, welches er mir während deren Fertigstellung ständig entgegenbrachte, sowie für seine mannigfachen Ratschläge herzlich zu danken. Desgleichen möchte ich Herrn Kantonschemiker Prof. Dr. Kreis, Basel, für die Überlassung der Zentrifuge, Herrn Prof. Dr. Metzner, Basel, für das Besorgen schwer zugänglicher Literatur, der Direktion des Baseler Schlachthauses für den kostenfreien Bezug vieler Blutproben, und dem Herrn Hallenmeister der Großhalle Basel für die große Mühe und Sorgfalt beim Abfüllen und Defebrinieren des Blutes meinen besten Dank sagen.

Basel, Physikalische Anstalt im Bernoullianum, Februar 1925.

Curriculum vitae.

Ich, Josef Pius Strub, wurde am 24. März 1901 zu Emmendingen, Baden, als Sohn des Bau- und Möbelzeichners Gotthard Strub und seiner Ehefrau Sophie, geb. Hausch, geboren. Ich besuchte die Volks- und Realschule meiner Vaterstadt und bezog danach 1917 das Realgymnasium zu Freiburg i. B., wo ich im Juli 1920 an der Realabteilung die Matura ablegte. Darauf studierte ich 5 Semester an der dortigen Universität und schrieb mich dann im Sommersemester 1923 an der Universität zu Basel ein. Im Sommer 1924 legte ich hier die Mittellehrerprüfung ab.

Während meiner Studienzeit besuchte ich Vorlesungen, Übungen und Seminarien in: Exp. Physik, Theor. Physik, Astronomie, Mathematik, Chemie, Geologie, Mineralogie, Zoologie, Philosophie, Pädagogik und Romanischer Philologie.

Meine Lehrer waren die Herren Professoren:

In Freiburg i. B.: F. Himstedt, Koenigsberger, Ansel, L. Heffter, A. Loewy, Seith, W. Meigen, Fromm, Wieland, Schwarz, Deeke, Speemann, Guenther, Jos. Geyser, Mehlis, Pauffler.

In Basel: A. Hagenbach, H. Zickendraht, H. Veillon, W. Matthies, H. Mohrmann, O. Spiess, F. Fichter, H. Rupe, P. Häberlin, R. Flatt.

Ich möchte es nicht unterlassen, auch an dieser Stelle allen meinen hochverehrten Lehrern meinen besten Dank für ihre Mühe auszusprechen, besonders Herrn Prof. Dr. Aug. Hagenbach, unter dessen Leitung vorliegende Arbeit im Sommer 1923 entstanden und Frühjahr 1925 abgeschlossen worden ist.